

Über temperatur- und druckinduzierte
Enzymaktivitätsverluste,
dargestellt am Beispiel des Pankreatins

von
Winfried Hamperl
aus Weiden/Oberpfalz

Diss. Erlangen
1984

1984 # 124



Über temperatur- und druckinduzierte
Enzymaktivitätsverluste,
dargestellt am Beispiel des Pankreatins

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Winfried Hamperl
aus Weiden/Oberpfalz

Als Dissertation genehmigt von den
Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität
Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.1984

Vorsitzender der

Promotionskommission : Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatler : Professor Dr. E. Nürnberg

Zweitberichterstatler : Professor Dr. H. Rupprecht,
Regensburg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 1980 bis November 1983 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie, der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Meinem sehr verehrten akademischen Lehrer, Herrn Professor Dr. E. Nürnberg, danke ich für Überlassung des Themas sowie die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise bei der Durchführung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Technologie gilt mein Dank für wertvolle Diskussionsbeiträge, insbesondere Herrn Dr. D. Schenk für die Entwicklung von Rechnerprogrammen, den Herren W. Müller und L. Drechsler für die Ausführung feinmechanischer Arbeiten sowie Fräulein Schedl für zahlreiche photographische Arbeiten. Frau K. Gast danke ich für die gewissenhafte und geduldige Durchführung der Schreibmaschinenarbeiten.

Innerhalb der Universität gilt mein Dank:

Herrn Dr. Aschoff für die Durchführung der diskelektrophoretischen Arbeiten.

Herrn Dr. Hahn und Herrn Gillich für die Benutzung einer hydraulischen KBr-Pressen und eines Chromatogrammspektralphotometers.

Der Firma W. Fette, Schwarzenbek, danke ich für die Möglichkeit, Preßversuche im Technikum ihres Betriebes durchzuführen. Für die großzügige Unterstützung bei den Versuchsarbeiten sei Herrn Stüben und Herrn Deusch gedankt.

Ferner danke ich der Firma E. Merck, Darmstadt, insbesondere Herrn Dr. Loebich, für die Überlassung sehr großer Mengen von Pankreatin und Nutrizym-Granulat, sowie Herrn Dr. Grigo für die Keimidentifizierung und die Überlassung von Testorganismen.

Weiterhin gilt mein Dank der Firma NUKEM, Hanau, für die Möglichkeit zur quasiisostatischen Verpressung von Pankreatin.

Den Firmen Bayer, Leverkusen; Lehmann & Voss & Co., Hamburg; Degussa, Frankfurt/Main; Brunnengräber, Lübeck; Firmenich, Genf, und Dragoco, Holzminden, danke ich für die großzügige Überlassung von Wirk- und Hilfsstoffen.

Ferner danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Personalmitteln.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Warenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären.

Nach dem Gesetz über die Einheiten im Meßwesen vom 2.7.1969, geändert am 6.7.1973, ist die offizielle Einheit für Temperaturangaben Kelvin (K). Zum besseren Verständnis sind im Text die Werte der Celsiusskala in Klammern beigefügt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0013

Für Katrin

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung und Zielsetzung</u>	1
2.	<u>Pankreatin, ein Problemarzneistoff</u>	4
2.1.	Die Verdauung	4
2.1.1.	Verdauungsorgane, Verdauungsenzyme und Nahrungsmittelresorption	4
2.1.2.	Pankreas und Pankreaserkrankungen	8
2.2.	Die Herstellung von Pankreatin	12
2.3.	Charakterisierung von Pankreatin	13
2.3.1.	Pulvertechnologische Kennzahlen	14
2.3.2.	Polarisations- und Rasterelektronenmikroskopie	19
2.3.3.	Röntgendiffraktometrische und differential- thermoanalytische (DTA) Untersuchungen	27
2.4.	Galenische Problemstellungen	32
2.4.1.	Tablettenzerfall, Enzymfreigabe	32
2.4.2.	Mikrobiologischer Status	33
2.4.3.	Verarbeitung von Pankreatin	33
3.	<u>Zersetzungskinetik der α-Amylase in Pankreatin</u>	35
3.1.	Enzyme und Enzymdenaturierung	35
3.2.	Thermische Zersetzung	38
3.2.1.	Versuchsdurchführung	38
3.2.2.	Ergebnisse	39
3.2.3.	Reflexionsphotometrische Untersuchungen von thermisch belastetem Pankreatin	44
3.3.	Zersetzung bei mechanischer Beanspruchung	50
3.3.1.	Inaktivierung durch Druckeinwirkung	50
3.3.2.	Tribomechanische Zersetzung	54
3.4.	Diskussion der Ergebnisse	55

4.	<u>Tablettierung von Pankreatin</u>	60
4.1.	Theorie des Kompressionsprozesses	60
4.2.	Herstellung von Pankreatintabletten	63
4.2.1.	Temperaturerhöhung und Aktivitätsverluste durch Trockengranulation	64
4.2.2.	Tablettierung des Trockengranulats auf einer Hochleistungsrundläuferpresse	66
4.2.3.	Diskussion der Ergebnisse	68
4.3.	Tablettierung auf Exzenterpressen	70
4.3.1.	Verpressung bei Raumtemperatur auf einer instrumentierten Tablettenpresse	70
4.3.2.	Tablettierung im Kühlraum	74
4.4.	Verpressung auf einer gekühlten Rundläuferpresse	76
4.4.1.	Maschineller Aufbau	76
4.4.2.	Versuchsdurchführung	80
4.4.3.	Ergebnisse	82
4.4.4.	Zusammenfassung	92
4.4.5.	Tablettenkennzahlen in Abhängigkeit von Preßtemperatur und Preßkraft	93
4.4.6.	Mechanische und thermische Vorgänge bei der Tablettenbildung	97
4.4.7.	REM-Untersuchungen	100
4.5.	Stabilitätsuntersuchungen	107
4.5.1.	Untersuchungsergebnisse	107
4.5.2.	Maximale Preßdichte	112
4.5.3.	Enzymschädigung als Mehrstufenprozeß	114
4.5.4.	Denaturierung, Renaturierung, Denaturierung	115
4.5.5.	Diskussion	118
4.6.	Energetische Vergleichsuntersuchungen	119
4.6.1.	Beurteilung des Tablettierverhaltens an Hand von Kraft-Weg- und Kraft-Zeit-Diagrammen	119
4.6.2.	Mechanische und thermische Energiebeträge	130
4.7.	Zusammenfassung von Kapitel 4	135

5.	<u>Biochemie der Inaktivierung</u>	137
5.1.	Disk-elektrophoretische Untersuchungen	137
5.1.1.	Methode	139
5.1.2.	Untersuchungsergebnisse	141
5.2.	Gelfiltrationschromatographische Untersuchungen	146
5.2.1.	Methode	146
5.2.2.	Ergebnisse	146
5.3.	Diskussion	149
6.	<u>Kleine Komprimat</u>	152
6.1.	Quasistatische Komprimierung	152
6.1.1.	Prinzip dieses Kompaktierverfahrens	152
6.1.2.	Versuchsdurchführung	155
6.1.3.	Ergebnisse	157
6.2.	Herstellung kleiner Komprimat auf einer Exzenterpresse	165
6.3.	Zusammenfassung	167
6.4.	Einfluß der Tablettengröße auf die Enzymin- aktivierung	167
7.	<u>Mikrobiologische Aspekte</u>	172
7.1.	Screening Versuch zur Bestimmung der anti- mikrobiellen Wirkung ätherischer Öle und Terpene	173
7.1.1.	Verfahren	173
7.1.2.	Resultate des Screenings	175
7.2.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ätherischer Öle	179
7.2.1.	Methode	179
7.2.2.	Ergebnisse	181
7.3.	Konservierungsbelastungstest	182
7.3.1.	Tablettenherstellung	183

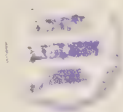
7.3.2.	Mikrobiologische Testung	184
7.3.3.	Resultate	185
7.3.4.	Bestimmung der Verfärbung von geruchstoff- haltigen Pankreatintabletten	188
7.3.5.	Zusammenfassung	190
7.4.	Einfluß der Preßkraft auf die Keimzahl von Komprimaten	191
8.	<u>Zusammenfassung</u>	194
9.	<u>Anhang</u>	198
9.1.	Tabellen	198
9.2.	Arbeitsvorschriften	203
9.2.1.	Bestimmung der Pankreasenzyme	203
9.2.1.1.	Bestimmung der α -Amylase nach der F.I.P.-Methode	203
9.2.1.2.	Bestimmung der Lipase nach dem F.I.P.-Prinzip	209
9.2.2.	Polyacrylamid Disk-Elektrophorese	213
9.2.3.	Bestimmung der keimbildenden Einheiten	219
9.2.4.	Berechnung der scheinbaren und der maximalen Preßdichte von Oblongtabletten	220
9.2.5.	Untersuchungen an Schüttgütern und Tabletten	223
9.3.	Statistik	224
9.4.	Verwendete Geräte	226
9.5.	Verwendete Materialien	234
9.5.1.	Pankreatin und die α -Amylase	234
9.5.2.	Weitere Materialien	235
10.	<u>Literatur</u>	237
	Lebenslauf	248

1. Einleitung und Zielsetzung

Fehlernährung, Übergewicht, Alkoholabusus und Stress belasten den menschlichen Organismus erheblich. Folge sind die uns allen bekannten Zivilisationskrankheiten wie Kreislauf- und Herzversagen, Magen- und Darmulcera u.a.m. (1). Ein Organ, an welches man in diesem Zusammenhang nicht sofort denkt, welches aber auch empfindlich auf ein solches menschliches Fehlverhalten reagiert, ist die BAUCHSPEICHELDRÜSE, das PANKREAS (2/3). - Die nachfolgenden Überlegungen beschränken sich auf den exokrinen Teil des Pankreas. - Akute und chronische Pankreatiden sind nicht selten die Folge einer derart falschen Lebensweise.

Da im exokrinen Pankreas die für die Verdauung wichtigen Enzyme LIPASE, PROTEASEN und α -AMYLASE gebildet werden, kommt es bei manifester Pankreasinsuffizienz zu schweren Verdauungsstörungen. Um die Symptome wie Maldigestion und Steatorrhoe zu beheben, wird in der Regel PANKREATIN substituiert. - Es fehlt allerdings nicht an kritischen Äußerungen über diese Therapie. Dies insbesondere, weil es sich in der Praxis eingebürgert hat, auch Patienten mit uncharakteristischen Verdauungsbeschwerden, Pankreasenzyme zu geben und die Wirkung bei dieser Indikation nur auf einem Placeboeffekt beruhen kann (2/4/5).

Pankreatin wird aus Schweine- und Rinderpankreas hergestellt. Es sollte eine hohe Enzymaktivität aufweisen, so daß man darauf achten muß, bei der Herstellung des Enzymkomplexes, d.h. des Ausgangsmaterials, und der galenischen Zubereitung die Denaturierung so gering wie möglich zu halten. Die einzelnen Arbeitsschritte führen bei diesen empfindlichen Proteinen angesichts der thermischen, mechanischen und chemischen Beanspruchung zwangsläufig zu mehr oder minder starken Enzyminaktivierungen, insbesondere bei α -Amylase und Lipase. So wurden Enzymaktivitätsverluste z.B. im Zuge der Tablettierung von über 30 % beschrieben (6/7).



Das Wesen der hierbei auftretenden Denaturierung ist zwar Gegenstand zahlreicher Publikationen, ohne daß bisher allerdings genaue Kenntnisse über die galenisch bedingten Inaktivierungsmechanismen vermittelt werden konnten (6/8/9).

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Klärung der Frage sein, ob die bei der Granulation und der Tablettierung auftretende Enzyminaktivierung vorwiegend THERMISCHER oder MECHANISCHER Natur ist. Darüber hinaus sollte nach pharmazeutisch-technologischen Möglichkeiten zur Inhibition von Denaturierungserscheinungen gesucht werden. Zur Klärung dieser Frage mußten gezielte Untersuchungen durchgeführt werden, die sich im einzelnen wie folgt gliederten:

- Studium der Zersetzungskinetik
 - bei thermischer
 - bei druckbedingter und
 - bei tribomechanischer Inaktivierung.
- Untersuchung des Preßverhaltens von Pankreatin bei verschiedenen Preßtemperaturen.
- Untersuchung zur Biochemie der Enzymdenaturierung und
- Verhalten des Pankreatins bei quasiisostatischer Verpressung.

Außer den technologischen Einflüssen müssen bei einem Organpräparat vom Typ des Pankreatins auch mikrobiologische Aspekte berücksichtigt werden. Es ist nicht verwunderlich, wenn in der Literatur Keimzahlen bis zu 10^6 KBE/g genannt werden (10/11/12). Physikalische oder chemische Keimreduzierungsmaßnahmen, die bei den meisten Wirkstoffen problemlos durchgeführt werden können, führen angesichts der beabsichtigten Schädigung des organischen Materials, d.h. der Mikroben, zwangsläufig auch zu einer Enzymdenaturierung.

In unserem Arbeitskreis konnte kürzlich von LOMMER (13) und POHLER (14) gezeigt werden, daß bestimmte ätherische Öle, bzw. Terpene als Konservierungsmittel, für Saft- und Mikroemulsionsgrundlagen erfolgreich eingesetzt werden können. Für Pankreatin sollte ein Geruchsstoff gefunden werden, der bei guter keimhemmender Wirkung möglichst keine enzymdenaturierende Wirkung besitzt.

Bevor auf die galenischen Aspekte näher eingegangen wird, soll zum besseren Verständnis ein kurzer Überblick über die Verdauung, das Pankreas und den Arzneistoff Pankreatin gegeben werden.

2. Pankreatin, ein Problemarzneistoff

2.1. Die Verdauung

2.1.1. Verdauungsorgane, Verdauungsenzyme und Nahrungsmittelresorption

Um den Stoff- und Energiebedarf des Organismus zu decken, müssen wir dem Körper Nahrung zuführen. Sinn der Verdauung ist es, diese Substanzen in resorbierbare Bestandteile zu zerlegen. Verdauung und Resorption ist Aufgabe des Gastrointestinaltraktes, dessen Organe durch anatomische Nachbarschaft und funktionelle Wechselwirkungen vielfältig miteinander verknüpft sind.

In der Mundhöhle beginnt die Verdauung. Hier wird die Nahrung mechanisch zerkleinert und mit dem aus den Speicheldrüsen sezernierten Mundspeichel - täglich 0,5 bis 1,5 l - innig durchmischt. Die im Speichel enthaltene α -Amylase Ptyalin beginnt bereits hier mit der Verdauung von Stärke und Glykogen.

Im Schluckakt gelangt die Nahrung über die Speiseröhre, den Oesophagus in den Magen (Gaster). Peristaltische Bewegungen der Magenwand vermischen die Nahrung mit dem Magensaft - Tagesproduktion 2 bis 3 l. Dieser ist beim gesunden Menschen stark sauer und enthält Pepsinogene, eine Magenlipase und den Intrinsicfaktor.

Im saueren Milieu des Magens werden die Nahrungsproteine und auch das Ptyalin des Speichels denaturiert, die Vorstufen der Magenproteasen, die Pepsinogene dagegen durch Autokatalyse aktiviert. Die Pepsine sind Endopeptidasen. Sie zeigen ein Wirkungsoptimum zwischen pH 1 und pH 4; dabei spalten sie Proteine bevorzugt an den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin.

Die im Magensaft vorkommende Magenlipase hat für die Verdauung von Fetten nur beim Säugling Bedeutung, da von ihr bevorzugt die in der Milch vorkommenden kurzkettigen Triglyceride ($C_4 - C_8$) hydrolysiert werden (15).

Die Magenentleerung in das Duodenum erfolgt durch kurzfristige Öffnung des Pylorus. Gelangt der Speisebrei in den Zwölffingerdarm, so kommt es zu einer Ausschüttung von Galle und Pankreassaft - täglich 1,5 bis 2 l. Auf Grund des hohen Hydrogencarbonatgehalts beider Flüssigkeiten wird der Chymus neutralisiert und die Pankreasenzyme können mit der Dünndarmverdauung beginnen (15/16/17). Tabelle 1 zeigt die wichtigsten im Verlauf der folgenden Ausführungen behandelten Enzyme des Pankreassaftes und gibt zugleich einen Überblick über deren Wirkmechanismus.

Neben den Pankreasenzymen sind aus der Darmwandung stammende Enzyme an der Verdauung beteiligt.

Im Dünndarm, der sich in Duodenum, Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm) aufgliedert, laufen somit die wichtigsten Verdauungsprozesse ab. Mund- und Magenverdauung sind demgegenüber nur von geringer Bedeutung (18). Wie Abbildung 1 zeigt, ist der Dünndarm auch der bevorzugte Ort für die Resorption der Nahrungsbestandteile. Schon nach der Passage des Jejunums ist beim Gesunden die Nährstoffaufnahme im wesentlichen abgeschlossen.

Der sich an das Ileum anschließende Dickdarm (Colon) dient zur Eindickung des Stuhls und somit der Rückresorption von Wasser.

Gesteuert werden diese Vorgänge zum einen durch gastrointestinale Hormone wie Gastrin, Sekretin und Cholecystokinin-Pankreozymin, sowie zum anderen neural über den Nervus vagus.

Tabelle 1 Die Verdauungsenzyme des Pankreassekrets (3)

Name	Molekulargewicht	pH-Optimum	Wirkungen und Anmerkungen
KOHLEHYDRATVERDAUUNG			
α -Amylase	48000	6,5 - 7,2	Spaltet Polysaccharide zu Maltose, wird in aktiver Form sezerniert
FETTVERDAUUNG			
Lipase	45000	7 - 9	Spaltet Triglyceride zu Fettsäuren und Glycerin, wird in aktiver Form sezerniert. Gallensalze verschieben das pH-Optimum in schwachsaure Bereiche und schaffen optimale Bedingungen für die Wirksamkeit der Lipase
Phospholipase A	13800 $\pm$ 500	7,9 - 8,4	Spaltet Phosphatide an C-2 in Lysophosphatide und Fettsäuren, wird als Proenzym sezerniert
Phospholipase B	15000-20000* (*MG des Isoenzyms aus dem Gehirn)	7,2 - 8,6	Spaltet von Lysophosphatiden an C-1 eine weitere Fettsäure ab, wird als Proenzym sezerniert
PROTEINVERDAUUNG			
Trypsin	23800	7 - 9	Spaltet als Endopeptidase Proteine und Polypeptide im Inneren des Moleküls, bevorzugt Peptidbindungen mit Arg und Lys. wird inaktiv sezerniert und durch Enteropeptidase (Enterokinase) aktiviert
Chymotrypsin A	25000	8 - 9	Sind wie Trypsin Endopeptidasen, spalten bevorzugt Peptidbindungen mit Phe, Tyr und Trp, werden durch Trypsin aktiviert
Chymotrypsin B	24000		
Chymotrypsin C	23800		
Elastase	?	?	Ist eine Endopeptidase, spaltet bevorzugt Peptidbindungen mit Val, Leu und Ala, greift Elastin an, wird als Proenzym sezerniert und durch Trypsin aktiviert
Carboxypeptidase A	34300	7,5 - 7,8	Spalten endständige Aminosäuren vom C-terminalen Ende der Peptide ab (Exopeptidasen), Aktivierung durch Trypsin
Carboxypeptidase B	34660 $\pm$ 600		
NUKLEINSAUREVERDAUUNG			
Ribonucleasen A-D	70000 - 140000	7,7	Spalten 3- und 5-Phosphatdiesterbindungen der Ribose in der RNS
Desoxyribonucleasen A-D	31000	6,0 - 7,0	Spalten 3- und 5-Phosphatdiesterbindungen der Desoxyribose in der DNS

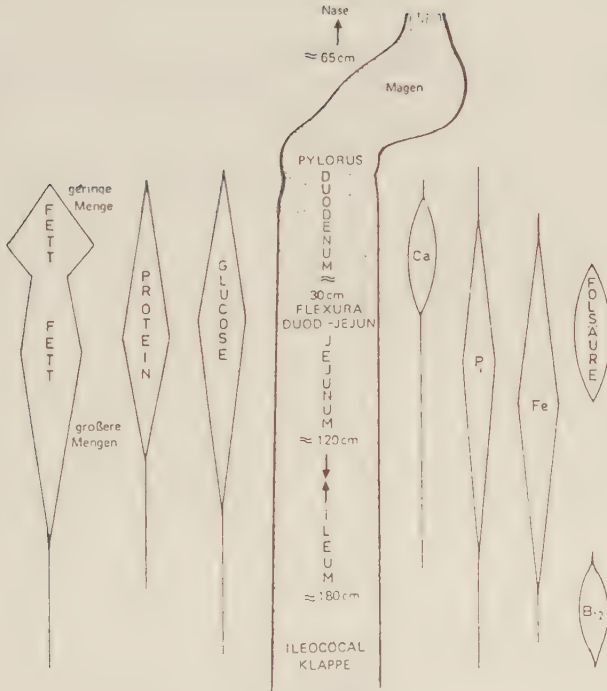


Abb. 1 Schematische Darstellung der Resorptionsorte wichtiger Nahrungsstoffe im Dünndarm. Der größte Durchmesser der Keile bezeichnet jeweils den Bereich, in dem die betreffende Substanz unter normalen Bedingungen zu 50 % resorbiert ist. Die weiterführenden Linien bedeuten potentielle Resorptionsflächen (z.B. nach Resektion von Dünndarmabschnitten) (19).

2.1.2. Pankreas und Pankreaserkrankungen

Anatomie

Das Pankreas ist ein langgestrecktes Organ. Es liegt im Oberbauch hinter dem Magen und ist 70 bis 90 g schwer. Man unterscheidet drei Teile:

- Der Kopf des Organs liegt der medianen Wand des Zwölffingerdarms an.
- Der Körper überkreuzt in Höhe der beiden ersten Lendenwirbelkörper die Wirbelsäule.
- Der Schwanz des Pankreas erstreckt sich bis zum Hilus der Milz im linken Oberbauch.

Das Organ wird in seiner gesamten Länge von einem Ausführungsgang durchzogen. Dieser mündet gemeinsam mit dem Gallengang in den Zwölffingerdarm (siehe Abbildung 2) (20).

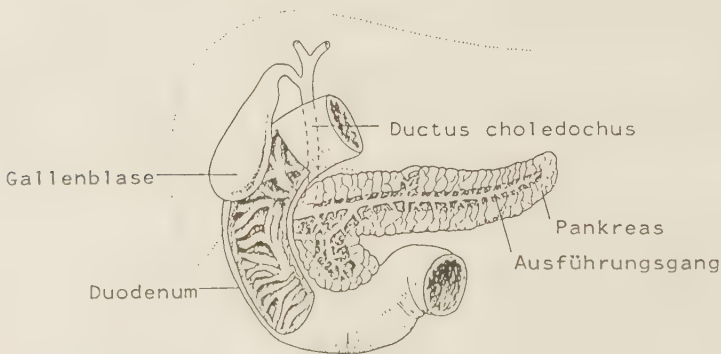


Abb. 2 Pankreas, Duodenum und Galle in ihrer natürlichen Lage im Oberbauch (20).

Morphologisch besteht das Pankreas aus größeren Lappen, die wiederum aus kleineren Läppchen zusammengesetzt sind. Letztere werden aus einzelnen Drüsenstücken, den Acini, gebildet (siehe Abbildung 3). Im Feinbau zeigen die Acinuszellen am Ende die sog. Zymogengranula. In diesen Vesikeln werden die Enzyme bzw. Proenzyme gespeichert und bei der Sekretion aus diesen sezerniert. Ebenso werden die Kationen Na^+ , K^+ sowie die Anionen Cl^- , und HCO_3^- des Pankreassaftes in die Lumina der Acini abgegeben. Dieses Primärsekret wird insbesondere in Bezug auf die Anionenkonzentration auf dem Weg durch die Drüsengänge noch verändert, indem Cl^- gegen HCO_3^- ausgetauscht wird. Die engen Lumina der Drüsenendstücke setzen sich in die sogenannten Schaltstücke fort, die in die Lichtung der einzelnen Acini eingestülpt erscheinen. Schaltstückzellen, die innerhalb der Drüsenendstücke liegen, werden als zentroacinäre Zellen bezeichnet. Die Schaltstücke münden direkt in die Ausführungsgänge (siehe Abbildung 3).



Abb. 3 Acinuszellen mit Zymogengranula, Schaltstück und centroacinäre Zellen des Pankreas (20).

Pro Tag produziert die Bauchspeicheldrüse 1,5 bis 2 l eines farblosen und transparenten Pankreassekretes. Der pH-Wert beträgt aufgrund des Hydrogencarbonatgehalts 8,0 bis 8,4 (20).

Dies ist für den Galeniker wichtig, da die Pankreasenzyme im sauren Milieu geschädigt werden, so daß Arzneizubereitungen in der Regel mit einem magensaftresistenten, dünndarmlöslichen Überzug versehen sind.

Pathophysiologie der Bauchspeicheldrüse

Die weitaus am häufigsten vorkommenden Pankreas-Erkrankungen faßt man unter dem Begriff "PANKREATITIS" zusammen. Es handelt sich dabei um Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse, die mit akuten oder chronischen Entzündungszeichen einhergehen. Nach klinischen Gesichtspunkten werden folgende Formen unterschieden:

A k u t - r e v e r s i b l e F o r m e n

- Akute Pankreatitis
- Akut-rezidivierende Pankreatitis

C h r o n i s c h - p r o g r e s s i v e F o r m e n

- Chronisch-rezidivierende Pankreatitis
- Chronische Pankreatitis

Neben den aufgeführten Erkrankungen kennt man noch die ZYSTISCHE PANKREASFIBROSE (MUKOVISZIDOSE), eine relativ häufig auftretende Erbkrankheit, und das PANKREAS-KARZINOM, das zumeist im Pankreaskopf lokalisiert ist (21).

Da wesentliche Verdauungsschritte von den Enzymen des Pankreas durchgeführt werden, kann es nach Schädigung der Bauchspeicheldrüse zur MALDIGESTION kommen. Dieses Syndrom tritt allerdings erst dann auf, wenn 80 bis 85 % des Pankreasparenchyms geschädigt sind (2). Ist dies der Fall, kommt es zu den Symptomen einer exkretorischen PANKREASINSUFFIZIENS wie GEWICHTSVERLUST, VÖLLEGEFÜHL, METEORISMUS und DURCHFALL. Diagnostisches Leit-

symptom ist die STEATORRHOE (15). Bei einem derartigen Krankheitsbild ist die Behandlung mit Verdauungsenzymen angezeigt.

Substitutionstherapie mit Pankreatin

Die wichtigsten Indikationen für eine Substitutionstherapie mit Verdauungsenzymen wurden von DÖLLE (22) folgendermaßen zusammengefaßt:

1. Bei Zustand nach Pankreasteilresektion oder Pankreatektomie.
2. Bei fortgeschrittener Zerstörung des Pankreas durch chronische Pankreatitis.
3. Bei Zustand nach Magenresektion, insbesondere bei Verlust der Pylorusfunktion infolge beschleunigter Passage der Ingesta, was zu einer relativen exkretorischen Pankreasinsuffizienz führt.

Nach PESCHKE (15) sollte eine derartige Substitutionstherapie nur mit Pankreatin erfolgen - nicht aber mit pflanzlichen und mikrobiellen Enzymen. Das Enzymgemisch muß dazu in hohen Dosen gegeben werden. Bei totaler Pankreasinsuffizienz sind täglich 200 000 bis 400 000 FIP-Einheiten Lipase* erforderlich (22), d.h. es müssen ca. 10 g hochaktiven Pankreatins pro Tag eingenommen werden.

* Die Lipase wird hier als Leitenzym verwendet, da bei totaler Pankreasinsuffizienz keine Fettverdauung mehr stattfindet, während Kohlenhydrat- und Proteinverdauung nur in geringerem Maße behindert werden.

Daraus ergeben sich Probleme bezüglich der Schaffung geeigneter Darreichungsformen. Heute werden außer Granulaten und Hartgelatine kapseln vielfach Dragees und Filmtabletten mit einem Enzymgehalt von ca. 500 mg in Formkörpern mit einem Gesamtgewicht von nahezu 1 g verabreicht. Unter Beachtung dieser Gesichtspunkte mußten bei den im folgenden beschriebenen experimentellen Arbeiten auf einen möglichst geringen Hilfsstoffanteil geachtet werden.

2.2. Die Herstellung von Pankreatin

Pankreatin ist ein Proteingemisch, welches aus den Bauchspeicheldrüsen von Schweinen und Rindern hergestellt wird. Die Enzymmuster von Schweine- und Rinderpankreatin sind unterschiedlich. Während der Bauchspeichel des Schweines dem menschlichen sehr ähnlich ist (siehe Tabelle 1), besitzt der des Rindes weit niedrigere α -Amylase- und Lipaseaktivitäten (23/24). Es ist daher verständlich, daß Pankreatin zum größten Teil aus den Bauchspeicheldrüsen von Schweinen gewonnen wird. Nach Angaben von PESCHKE (15) setzt sich ein frisch gewonnenes Schweinepankreas wie folgt zusammen (Mittelwert aus 50 Werten).

Drüsengewicht	133,5 g
Wassergehalt der Drüse	63,3 %
Fettgehalt der Drüse	17,3 %
Pankreatingehalt	19,4 %

Die Drüsen werden im Schlachthof entnommen, was die Gefahr einer Kontamination mit Fäkalkeimen (*Escherichia coli*, *Salmonellen*) beinhaltet, mechanisch von Fett- und Bindegewebe befreit und in tiefgefrorenem Zustand zu den Fabrikationsstätten gebracht. Hier werden die Drüsen zerkleinert. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die Temperatur nicht über 288 K

(15 °C) steigt, da sonst Lipase und Amylase geschädigt werden. Das zerkleinerte Drüsenmaterial kann nun unterschiedlich aufgearbeitet werden. Man unterscheidet zwei Methoden.

- 1) Aus dem Pankreasmaterial werden mit Wasser, Salzlösung oder Lösungsmitteln (verd. Glycerol, Ethanol 25 %, Essigsäure 20 %) die Enzyme gelöst und nach Filtration mit anorganischen Salzen, Lösungsmitteln oder Tannin wieder ausgefällt. Anschließend muß schonend getrocknet werden. Das anfallende Produkt ist wenig aktiv (24/15).
- 2) Produkte mit höherer Aktivität erhält man, wenn das eingefrorene Gut vorsichtig entwässert und entfettet wird. Dazu wird mittels Gefrier- oder Vakuumtrocknung das Wasser entfernt und danach mit organischen Lösungsmitteln (Dichlormethan) entfettet (25).
Eine gleichzeitige Entwässerung und Entfettung kann mit Aceton, Alkoholen oder Aceton-Ether-Mischungen durchgeführt werden (15).

Als Endprodukt erhält man ein gelblich weißes Pulver mit charakteristischem Geruch (siehe Abbildung 5 bis 16).

2.3. Charakterisierung von Pankreatin

Während im Europäischen und im Deutschen Arzneibuch Pankreatin nicht aufgeführt wird, enthalten die Arzneibücher der DDR, der CSSR, Österreichs, Japans, Italiens, Großbritanniens und der USA Pankreatin-Monographien. Neben allgemeinen Prüfmethoden, wie Trocknungsverlust, Fettgehalt, Keimzahlbestimmung, werden auch Methoden zur Enzymaktivitätsbestimmung angegeben, welche im wesentlichen auf den von der F.I.P. (Federation Internationale Pharmaceutique) entwickelten Vorschriften beruhen (24/26).

Eine FIP-AMYLASE-EINHEIT ist die Enzymmenge, die unter den Versuchsbedingungen Stärke mit einer solchen Anfangsgeschwindigkeit spaltet, daß je Minute 1 Mikroäquivalent an glukosidischen Bindungen hydrolysiert wird. Eine FIP-LIPASE-EINHEIT ist die Enzymmenge, die unter den Versuchsbedingungen aus Olivenöl-Emulsion 1 Mikroäquivalent Fettsäure je Minute freisetzt. Eine FIP-PROTEASE-EINHEIT ist die Enzymmenge, die unter den Versuchsbedingungen Casein mit einer solchen Anfangsgeschwindigkeit zu Trichloressigsäure-löslichen Peptiden hydrolysiert, daß je Minute eine Peptidmenge freigesetzt wird, die bei 280 nm die gleiche Extinktion wie 1 μmol Tyrosin hat (24/26).

Inzwischen verlangt auch das Bundesgesundheitsamt bei der Zulassung von pankreatinhaltigen Präparaten die Aktivitätsangabe in FIP-Einheiten.

2.3.1. Pulvertechnologische Kennzahlen

Für den pharmazeutischen Technologen ist der voluminöse Charakter des bei der Herstellung anfallenden Pankreatins wichtig. Die Substanz besitzt schlechte Fließeigenschaften, so daß um Schüttgüter zu erhalten, die auf Tabletten- oder Kapselfüllmaschinen verarbeitet werden können, im allgemeinen eine Granulation durchgeführt wird.

Da die Feuchtgranulation infolge einer Denaturierung der Enzyme durch organische Lösungsmittel und Wärmeeinfluß ebenso wie Zusatz von wässrigen Granulationsflüssigkeiten Probleme aufweist, wird vielfach das Verfahren der Trockengranulation angewendet. Die dabei auftretenden hohen Drücke führen allerdings auch zu einer partiellen Enzymschädigung.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bei der Herstellung anfallendes voluminöses Pankreatin (Pankreatin A) und ein Pankreatin-Trockengranulat (Trockengranulat N) eingesetzt.

Tabelle 2 zeigt die pulvertechnologischen Kennzahlen dieser Produkte. Außerdem sind noch zwei weitere im Handel erhältliche Pankreatintypen und ein selbst hergestelltes Feuchtgranulat mit aufgeführt. Im Vergleich dazu sind die Kennzahlen von Lactosemonohydrat angegeben.

Legende zu Tabelle 2

- 1) Rechnerische Auswertung auf der Grundlage der RRS-Gleichung (Abb. 4)
- 2) Werte durch Agglomeration der Partikel verfälscht
- 3) Mikroskopische Teilchengrößenbestimmung
- 4) Hausner-Faktor:

$$\frac{\text{Stampfdichte } (\rho_{\text{St}})}{\text{Schüttdichte } (\rho_{\text{S}})}$$

Er ist ein Maß für die Kompressibilität²² eines Haufwerks und sollte wenig über 1 liegen (27/28)

- 5) Fekrumeter (29)

$$6) \text{ PVK} = \frac{\text{Stampfgewicht } (\gamma_{\text{St}})}{\text{wahre Dichte } (\rho)} \times 100;$$

Maß für die sekundäre Agglomeration eines Haufwerks (27);
kubische Kugelpackungen besitzen eine PVK = 52,4 %

$$7) \text{ Nährungswert nach } O_v = \frac{6}{d_{50\%}} \quad (27)$$

- 8) Bestimmung mittels Thermogravimetrie (siehe 2.3.3.).

²² Unter Kompressibilität versteht man die Fähigkeit eines Schüttgutes, sich unter äußeren Einflüssen wie z.B. Druck zu einer dichteren Packung zu ordnen.

Tabelle 2 Pulvertechnologische Kennzahlen verschiedener Pankreatin-Typen

	Pankreatin A (MERCK 4 x NF)	Pankreatin B (BRUNNENGRÄBER 6 x NF)	Pankreatin C (BRUNNENGRÄBER 6 x NF)	Trockengranulat N (Nutrizyngranulat 4 x NF)	Feuchtgranulat (Isopropanol/ H ₂ O)	Lactose- Monohydrat
Korngrößenverteilung (RRS)						
d _{50%} Durchgang (µm) 1)	385 2)	628	203	356	429	177
kennzeichnender Korn- durchmesser d' (µm) 1)	465 2) (4,8-480µm) 3)	708	226	429	502	194
Gleichmäßigkeitzahl n 1)	1,94 2)	2,47	1,53	1,96	2,3	4,60
Böschungswinkel α (°)	56	43	60	47	53	44
Schüttgewicht (g/cm³)	0,27	0,42	0,43	0,54	0,32	0,79
Stampfgewicht (g/cm³)	0,39	0,50	0,54	0,68	0,42	0,87
Hausner-Faktor 4)	1,44	1,19	1,26	1,26	1,31	1,10
wahre Dichte (g/cm³) 5)	1,428	1,406	1,436	1,411	---	1,556
Pigmentvolumenkonzentration=PVK (%) 6)	27,3	35,6	37,6	48,0	---	55,9
Spezifische Oberfläche 7)						
Gewichtsbezogen (cm²/g)	109,13	60,28	205,6	119,4	---	217,9
Volumenbezogen (cm²/cm³)	155,84	84,75	295,6	168,5	---	339,0
Wassergehalt (%) 8)	5,3	5,1	5,4	4,5	---	5 %

Vergleicht man die galenischen Kennzahlen der untersuchten Produkte, so können folgende Aussagen getroffen werden:

- 1) Pankreatin A ist sehr voluminös; dies zeigt auch der hohe Hausner-Faktor. Die niedrige PVK deutet auf eine starke Agglomeration im Sinne einer Sekundärverfilzung hin. Das Fließverhalten ist entsprechend schlecht - Heuhaufencharakteristik -, so daß eine Direkttablettierung in den meisten Fällen prohibitiv ist.
- 2) Pankreatin B ist ein grobkörniges Produkt mit guten Fließ-eigenschaften. Die Kompressibilität ist gering, die Sekundäragglomeration niedriger als bei Produkt A. Allerdings stand dieses Material - ebenso wie Produkt C - nicht in den erforderlichen großen Mengen zur Verfügung.
- 3) Pankreatin C, ein feinkörniges Gut, zeigt schlechtes Fließverhalten. Die Kompressibilität ist höher als bei Produkt B, die "Sekundäragglomeration" geringer.
- 4) Das Trockengranulat N zeigt befriedigende Fließ-eigenschaften, die Kompressibilität hat sich in Praxi als ausreichend erwiesen und die "Sekundäragglomeration" liegt im Bereich der einer kubischen Kugelpackung (siehe Legende zu Tabelle 2). Das Granulat ist, wie später beschriebene Untersuchungen ergaben, auf Hochleistungsrundläufern gut verpreßbar (siehe 4.2.2.). Abbildung 4 zeigt die Auswertung der Siebanalyse mit der typischen Korngrößenverteilung eines Trockengranulates durch Darstellung im RRSB-Körnungsnetz. Als Berechnungsgrundlage diente das Rosin-Rammlersche-Gesetz (30):

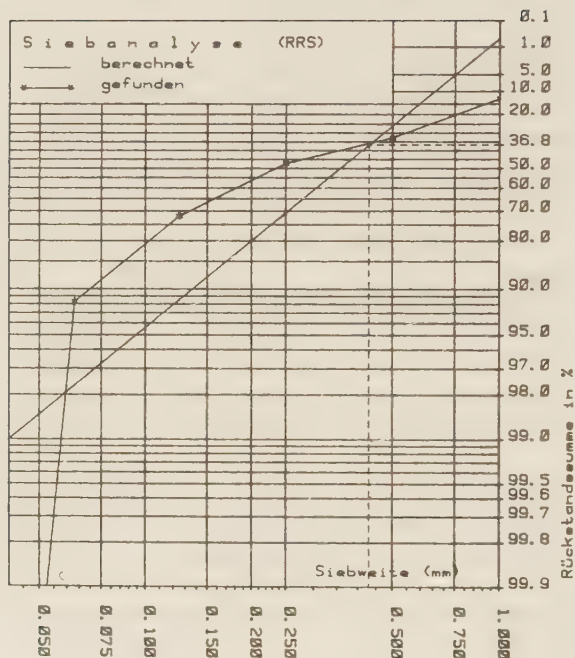
$$R = 100 e^{-(d/d')^n} \quad (Gl. 1)$$

R = Siebrückstand in %

d = Korngröße

d' = kennz. Korndurchmesser

n = Gleichmäßigkeitszahl



Trockengranulat N

Kennzeichnender Korn-
durchmesser

0.429 mm

Gleichmäßigkeitzahl

1.958

Binom. Mittelwert

0.380 mm

Binom. Standardabw.

0.202 mm

Restvarianz bei

Weibullverteilung 334.257
mit 4 Freiheitsgraden

Siebweite in mm	% Rückstand	
	gefunden	berechnet
1.000	12.88	0.53
0.500	19.82	25.47
0.250	14.59	44.71
0.125	24.70	20.75
0.063	19.72	6.22
0.040	8.25	1.34

Abb. 4 Auswertung der Siebanalyse von Trockengranulat N durch Darstellung im RRSB-Körnungsnetz.

- 5) Aus Produkt A wurde mit Isopropanol/Wasser, 88/12, unter Einsatz eines 1 mm-Siebes und Hordentrocknung bei ca. 50 °C ein Feuchtgranulat hergestellt. Es zeigt gegenüber dem Ausgangsprodukt keine wesentlich besseren galenischen Eigenschaften. Da bei der Feuchtgranulierung unter den beschriebenen Versuchsbedingungen die Enzymaktivität stark abnahm (- 60 %) wurde dieses Granulat nicht weiter untersucht.

- 6) Der Wassergehalt aller untersuchten Proben liegt mit ca. 5 % in einem günstigen Bereich. Bei einem zu niedrigen Wassergehalt kann es zu einer Dehydratation der Proteine und so zu einer Denaturierung kommen (31). Im übrigen zeigt eine stärkere Trocknung wenig Sinn, da Pankreatin bei seiner Weiterverarbeitung die entsprechende Feuchte wieder aufnimmt (25). Allerdings muß auch ein zu hoher Wassergehalt vermieden werden, da die Lagerstabilität der Enzyme dadurch signifikant erniedrigt wird (23).

2.3.2. Polarisations- und Rasterelektronenmikroskopie

Da sich die verschiedenen Pankreatintypen hinsichtlich ihrer galenischen Kennzahlen stark unterscheiden, und m.W. polarisations- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen nicht bekannt waren, erschien es zweckmäßig, diese mit den verschiedenen Präparaten durchzuführen.

Im POLARISATIONSMIKROSKOP fehlen, wie aus Abbildung 5, 6 und 7 hervorgeht, die für anisotrope Stoffe charakteristischen Polarisationsfarben, was aber nicht auf die geringe Teilchengröße zurückzuführen ist, da auch nach einer Kompaktierung von reinem Pankreatin erhaltene gröbere Partikel nicht optisch anisotrop waren. Dafür sprechen auch röntgendiffraktometrische Untersuchungen im Bereich von $2\theta = 5^\circ - 35^\circ$: Reines und kompaktiertes Pankreatin zeigten keine Reflexe, sofern keine anisotropen anorganischen Verunreinigungen enthalten waren.

Die im Trockengranulat N auftretenden Polarisationsfarben (Abbildung 8) sind auf die schon vor der Kompaktierung zugesetzten Tablettierhilfsstoffe zurückzuführen.

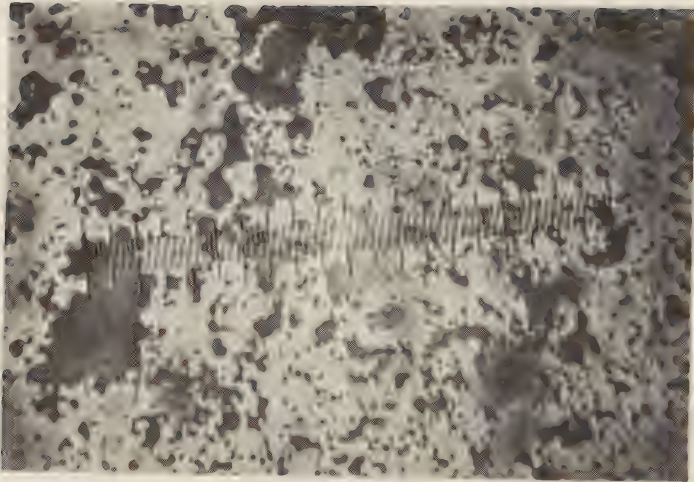


Abb. 5 Polarisationsmikroskopische Aufnahme von Pankreatin A (Pankreatin 4 x NF, MERCK).



Abb. 6 Polarisationsmikroskopische Aufnahme von Pankreatin B (BRUNNENGRÄBER Granulat 6 x NF).

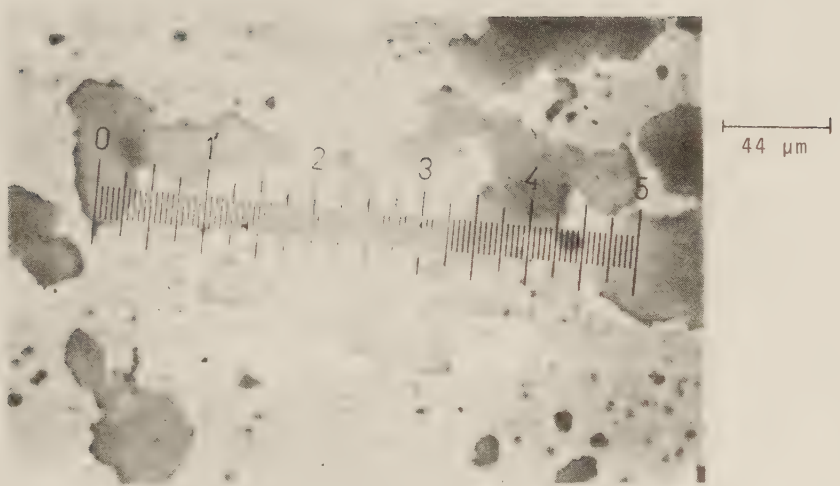


Abb. 7 Polarisationsmikroskopische Aufnahme von Pankreatin C (BRUNNENGRÄBER Pulver 6 x NF).

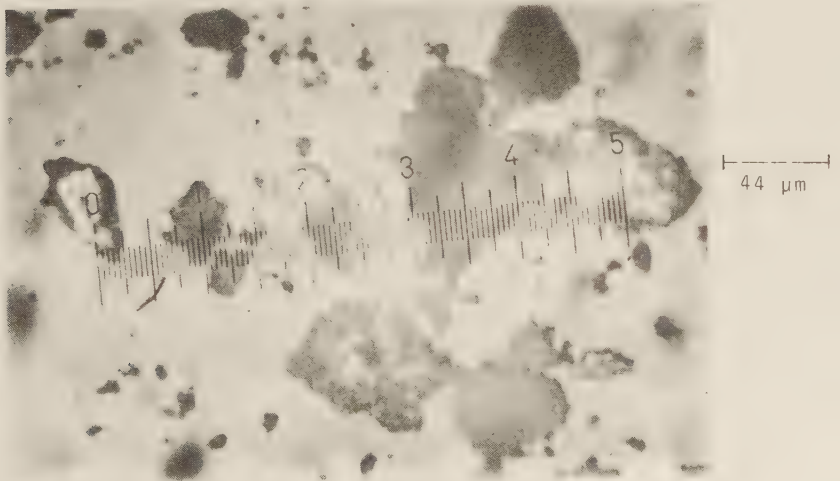
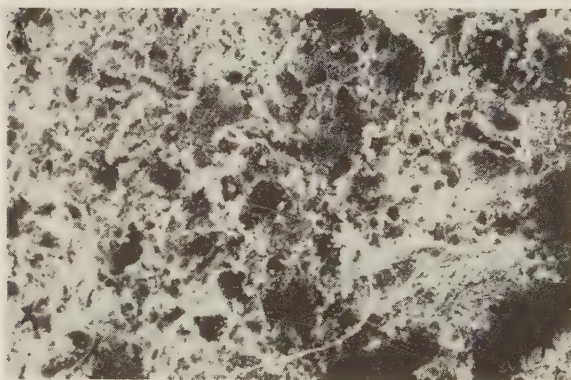


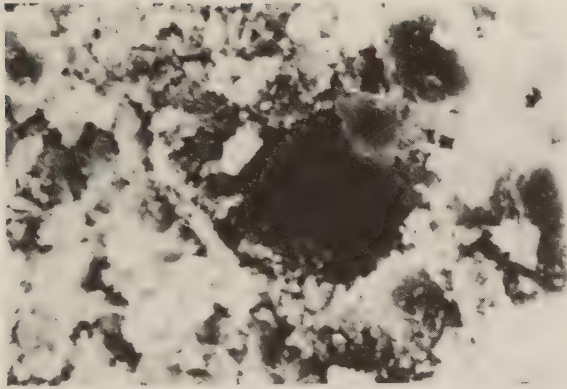
Abb. 8 Polarisationsmikroskopische Aufnahme von Trockengranulat N (Nutrizym-Granulat, MERCK, ca. 4 x NF), Erklärung im Text.

Aus den Abbildungen geht auch hervor, daß sich die untersuchten Pankreatinproben hinsichtlich ihrer Form stark unterscheiden. Noch deutlicher zeigt dies die RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE (Abbildung 9 bis 16). Während das voluminöse Produkt A noch die filigranartige Struktur eines getrockneten und entfetteten Organs besitzt (Abbildung 9), sind die restlichen Substanzen mehr oder minder kompakt, was bei stärkerer Vergrößerung (s. Abbildung 10, 12, 14 und 16) deutlich zu erkennen ist.



80 μm

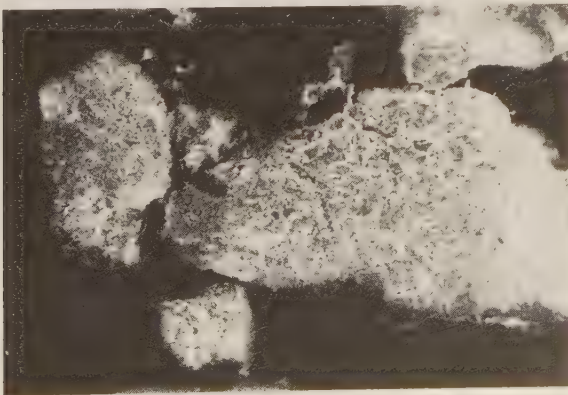
Abb. 9 REM-Aufnahme von Pankreatin A (Pankreatin 4 x NF, MERCK).



16 µm

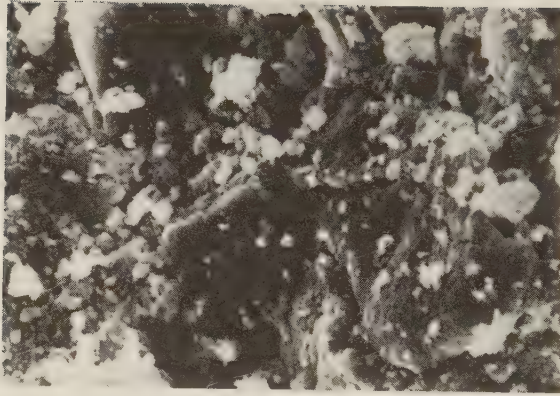
Abb. 10 REM-Aufnahme von Pankreatin A (Pankreatin 4 x NF, MERCK).

Bei der Granulation soll grundsätzlich eine Verdichtung des Pulvers erfolgen; ob es dabei lediglich zu einer Verformung oder zu einer Fusion der Ausgangspartikel kommt, sollten weitere REM-Untersuchungen zeigen.



530 µm

Abb. 11 REM-Aufnahme von Pankreatin B (BRUNNENGRÄBER Granulat 6 x NF).



16 μm

Abb. 12 REM-Aufnahme von Pankreatin B (BRUNNENGRÄBER Granulat 6 x NF).



160 μm

Abb. 13 REM-Aufnahme von Pankreatin C (BRUNNENGRÄBER Pulver 6 x NF).

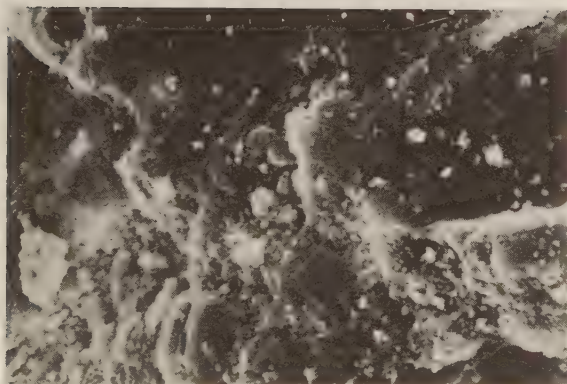


Abb. 14 REM-Aufnahme von Pankreatin C
(BRUNNENGRÄBER Pulver 6 x NF).

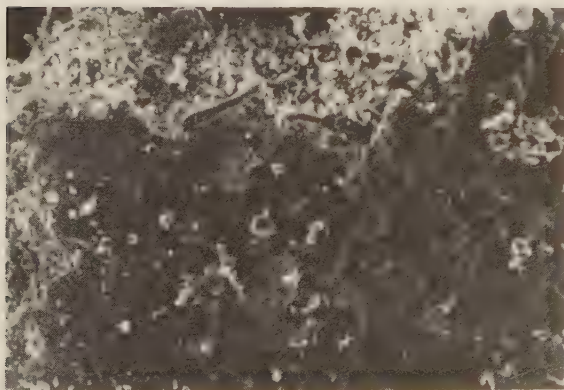
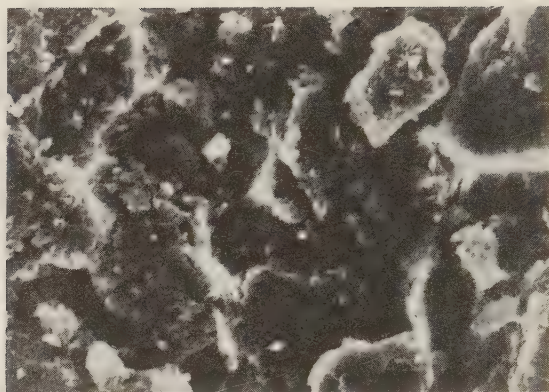


Abb. 15 REM-Aufnahme von Trockengranulat N
(Nutrizym-Granulat, MERCK).



16 μm

Abb. 16 REM-Aufnahme von Trockengranulat N (Nutrizym-Granulat, MERCK).

Wie die Aufnahmen zeigen, handelt es sich bei den Pankreatintypen B und C um Granulate, wobei Pankreatin B ein Grobkorn und Pankreatin C ein Feinkorn darstellt (s. Tabelle 2). Ebenso wie bei dem untersuchten Trockengranulat N ist kaum noch die Feinstruktur der getrockneten Organsubstanz zu erkennen.

Die Produkte B, C und Trockengranulat N erscheinen bei REM-Betrachtung ebenso wie plastisch verformbare Wirk- und Hilfsstoffe vom Typ des Paracetamols (32) und der Lactose (33/34). Die polarisations- und REM-Aufnahmen erklären sehr gut die Unterschiede der einzelnen Pankreatinprodukte hinsichtlich ihrer pulvertechnologischen Eigenschaften.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß, wie auch von GRAF et al. (7) festgestellt, unter dem Namen Pankreatin sehr unterschiedliche Produkte im Handel sind. Die Autoren untersuchten ebenfalls die Eigenschaften von vier Pankreatintypen verschiedener Hersteller. Sie stellten fest, daß kein Produkt mit dem anderen verglichen werden kann, und daß sogar von Charge zu Charge starke Unterschiede hinsichtlich der galenischen Eigenschaften auftreten.

Somit muß bei der Weiterverarbeitung von Pankreatin zu Granulaten oder Tabletten nicht nur auf die Enzyminaktivierung, sondern auch auf die verfahrenstechnischen Parameter geachtet werden.

2.3.3. Röntgendiffraktometrische und differentialthermoanalytische (DTA) Untersuchungen

Polarisationsmikroskopisch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß in Pankreatin ähnlich wie bei anderen makromolekularen Substanzen zwar keine kristallinen, aber dennoch mehr oder minder geordnete Bereiche anzutreffen sind. RÖNTGENDIFFRAKTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN im Weitwinkelbereich von Pankreatin A zeigten ein amorphes Halo (Abbildung 17).

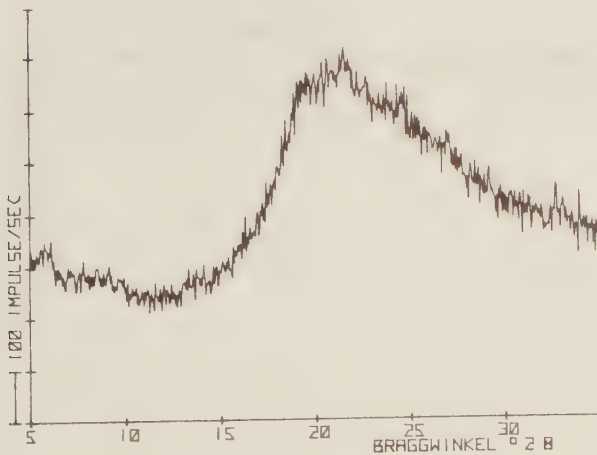


Abb. 17 Röntgendiffraktogramm einer "amorphen" Charge Pankreatin 4 x NF.

Bei einigen Chargen des gleichen Produktes traten aber diskrete Reflexe mit einem charakteristischen Peak bei $2\theta = 31,4^\circ$ (Abbildung 18) auf, die möglicherweise auf anisotrope Verunreinigungen mit anorganischen Salzen zurückgeführt werden könnten. Zur Klärung dieser Frage wurden die Glührückstände untersucht.

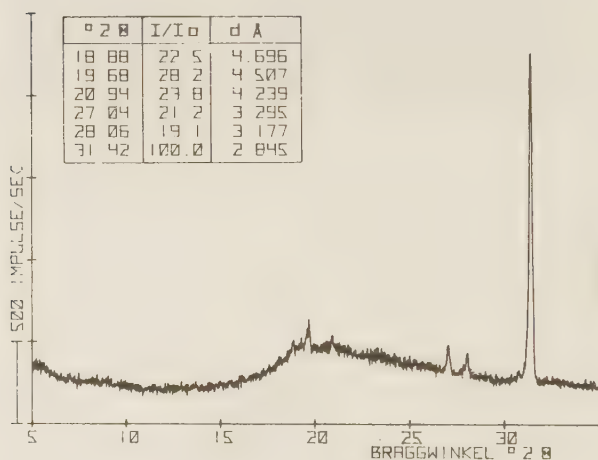


Abb. 18 Röntgendiffraktogramm einer röntgenanisotropen Charge Pankreatin 4 x NF.

Sie wiesen für beide Chargen ein analoges Verhalten auf (Abbildung 19).

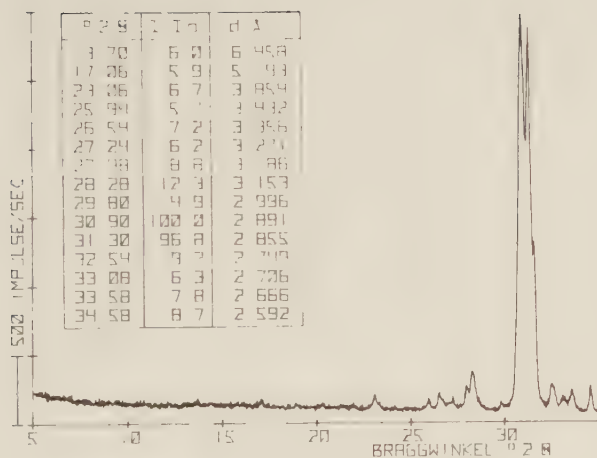


Abb. 19 Röntgendiffraktogramm des Glührückstandes der "amorphen" Charge Pankreatin 4 x NF.

Somit kann gefolgert werden, daß die anorganischen Beimengungen von 10 - 15 % für die Röntgenanisotropie einiger Chargen verantwortlich sind. Auf die galenischen Eigenschaften hatten diese Unterschiede keinen Einfluß.

DTA-UNTERSUCHUNGEN ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf einen Ordnungszustand der Proteinmoleküle (Abbildung 20).

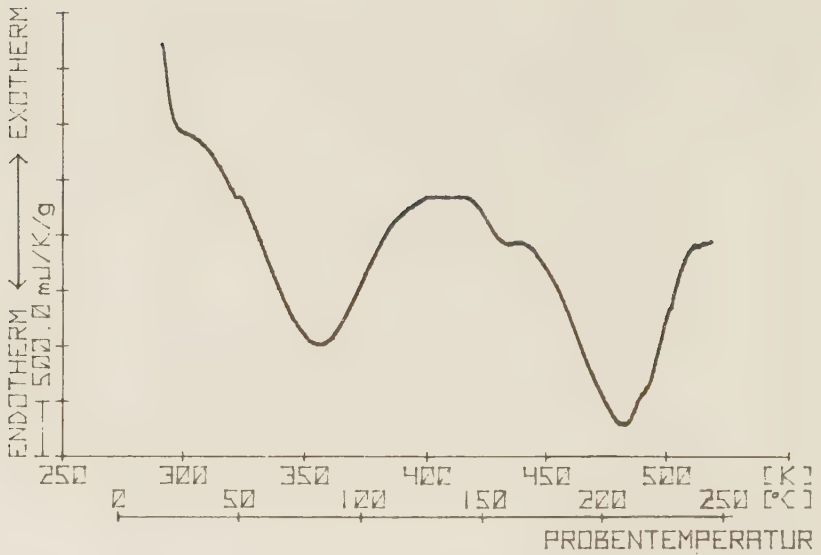


Abb. 20 DTA-Kurve von Pankreatin 4 x NF.

Das differentialthermoanalytische Verhalten von Pankreatin läßt sich in zwei Abschnitte einteilen:

- Austritt des enthaltenen Wassers bis 400 K (127 °C).
- Thermische Zersetzung, die bei diesem Mischpräparat ab 423 K (150 °C) in mehreren Stufen abläuft.

Thermogravimetrische (TG) Untersuchungen bestätigten dieses Verhalten (Abbildung 21).

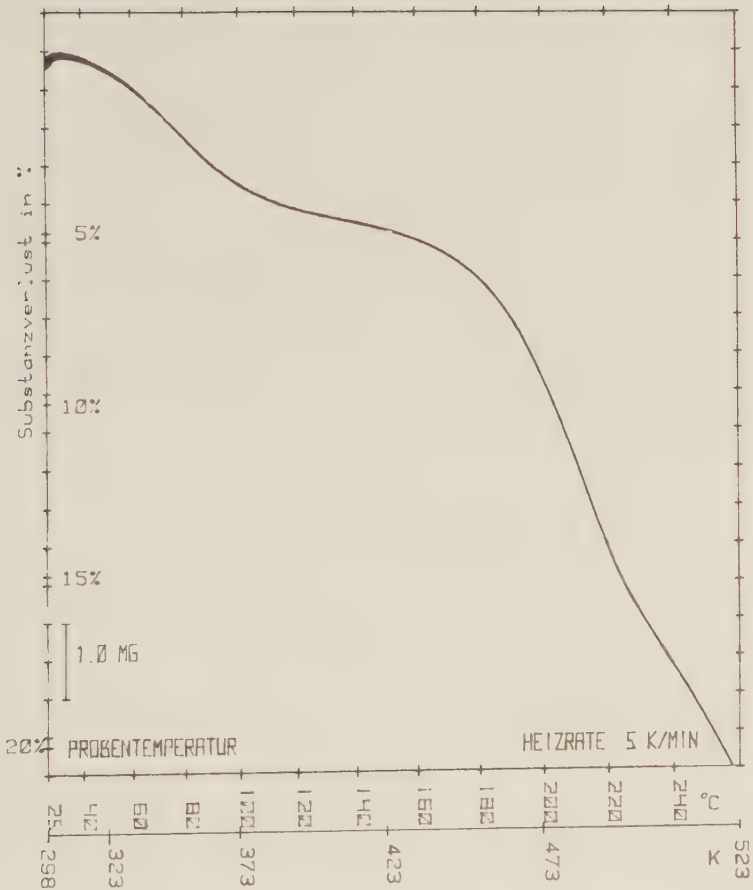


Abb. 21 TG-Kurve von Pankreatin 4 x NF in N_2 -Atmosphäre.

Da bis 423 K (150 °C) keine gewichtsmindernde, pyrolytische Zersetzung eintrat, konnte der Wassergehalt des Proteingemisches und seiner Zubereitungen mittels TG bestimmt werden (35). Die erhaltenen Werte korrelierten mit den KARL-FISCHER-Werten (5 % H_2O).

Das DTA-Profil war bei fünf verschiedenen Chargen sowie auch bei Produkten verschiedener Hersteller gleich.

2.4. Galenische Problemstellungen

Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen ergibt sich eine Fülle an Problemen, die bei der galenischen Verarbeitung eines Pankreatinpräparates beachtet werden müssen. Wenngleich einige schon angesprochen wurden, so sollen im folgenden die wichtigsten klar herausgestellt werden.

2.4.1. Tablettenzerfall, Enzymfreigabe

Die Wirksamkeit eines Enzympräparates kann nur dann garantiert werden, wenn ausreichende Mengen im Duodenum, d.h. unmittelbar nach der Magenpassage, freigesetzt werden. Angesichts der Tatsache, daß Pankreatintabletten ein hochkonzentriertes Proteingemisch darstellen, müssen Verklebungerscheinungen berücksichtigt werden. Dieser Umstand bereitet dem pharmazeutischen Technologen erhebliche Schwierigkeiten, da er im allgemeinen nur eine begrenzte Menge an desintegrationsfördernden Mitteln zusetzen kann.

Während man früher Tabletten mit einer protrahiert stattfindenden Enzymfreisetzung entwickelt hatte, bemüht man sich in den letzten Jahren um besser zerfallende Komprimat oder man wählt andere Arzneiformen wie Hartgelatinekapseln und Granulate.

Um die Verdauungsleistung von Pankreatinpräparaten in vitro vergleichen zu können, wurde der Begriff "digestive Potenz" (36/15) eingeführt. Nach MÖLLER (37) und PESCHKE sollte diese Größe allerdings durch die aussagekräftigere "pharmazeutische Verfügbarkeit" ersetzt werden.

2.4.2. Mikrobiologischer Status

Aufgrund der Lage der Bauchspeicheldrüse in der Bauchhöhle besteht immer die Gefahr, daß sie in den Schlachthöfen mit Colibakterien, Pseudomonaden, Salmonellen und ähnlichen Mikroorganismen kontaminiert wird. Da keiner der genannten Keime im Endprodukt enthalten sein darf, müssen bei der Aufarbeitung des Pankreatins Maßnahmen angewandt werden, welche die Abwesenheit pathogener Keime sowie die Keimreduzierung von apathogenen Mikroorganismen auf die zulässigen Werte von max.

10^4 KBE/g garantieren. Eine wirksame Keimzahlverminderung kann zwar mit Isopropanol und Gammastrahlen (38) bzw. Äthylenoxid (39) erfolgen; indessen führen diese Methoden im allgemeinen zu Verlusten an enzymatischer Aktivität. Insbesondere die Lipase und die α -Amylase werden in ihrer Wirkung geschwächt. Damit ist eine weitere Problematik bei der Herstellung und galenischen Weiterverarbeitung von Pankreatin angesprochen: Maßnahmen zur wirksamen Keimreduzierung führen praktisch immer zu Aktivitätsverlusten.

2.4.3. Verarbeitung von Pankreatin

In der Roten Liste 1982 sind 89 pankreatinhaltige Präparate aufgeführt. Nach galenischen Gesichtspunkten kann man diese wie folgt einteilen:

- Dragees	51
- Lacktabletten	15
- Tabletten	8
- Kautabletten	1
- Kapseln	5
- Granulate	4
- Pulver	3
- Tropfen	2

Fast 85 % aller Enzym-Darreichungsformen werden also bei ihrer Herstellung tablettiert. Wie schon erwähnt, betragen die bei der Tablettierung auftretenden Enzymaktivitätsverluste für Lipase und α -Amylase zum Teil über 30 % (6/7). Derart hohe Rückgänge sind sowohl aus therapeutischer als auch aus finanzieller Sicht untragbar.

Um diese Aktivitätsverluste zu vermeiden, müssen zunächst deren Ursachen bekannt sein. Daher soll, bevor genauer auf die Tablettierung des Pankreatins eingegangen wird, die Zersetzung der pankreatischen α -Amylase bei THERMISCHER und MECHANISCHER Belastung untersucht werden.

3. Zersetzungskinetik der α -Amylase in Pankreatin

3.1. Enzyme und Enzymdenaturisierung

Will man das komplexe Geschehen bei der pharmazeutisch-technologischen Verarbeitung von ENZYMEN verstehen, muß man berücksichtigen, daß diese eine hoch spezifische Struktur besitzen. Einige sind einfache, andere zusammengesetzte Proteine und enthalten prosthetische Gruppen wie Metallionen, Co-enzyme oder beides.

Die AMINOSÄURESEQUENZ, die sogenannte PRIMÄRSTRUKTUR, bestimmt die KONFORMATION, d.h. die SEKUNDÄR-, TERTIÄR- und QUARTÄRSTRUKTUR eines Enzymes, und zwar im wesentlichen durch die Größe, Polarität und Ladung der Aminosäureseitengruppen. Vereinfacht erfolgt der Aufbau eines Enzyms dabei so, daß die hydrophoben Seitenketten im Innern, die hydrophilen dagegen an der Oberfläche des Moleküls zu liegen kommen. Fast alle Enzyme sind GLOBULÄRE EIWEISSMOLEKÜLE. Mehrere Tertiärstrukturen können sich zu einer Quartärstruktur zusammenlagern. Dadurch entstehen oligomere Enzyme, wie dies auch bei der α -Amylase aus Pankreatin der Fall ist.

Das für die Katalyse verantwortliche aktive Zentrum eines Enzyms liegt in einem Einschnitt der Tertiärstruktur. Es besteht aus einem Bindungszentrum und dem eigentlichen katalytischen Zentrum. Diese Eigenschaft verleiht dem Enzym eine hohe Substrat- und Wirkungsspezifität (40/41/42). Beide Fähigkeiten sind unabdingbar mit der unversehrten Konformation des Enzyms verbunden.

Abbildung 22 zeigt die Struktur-Wirkungs-Beziehung am Beispiel des Chymotrypsins.

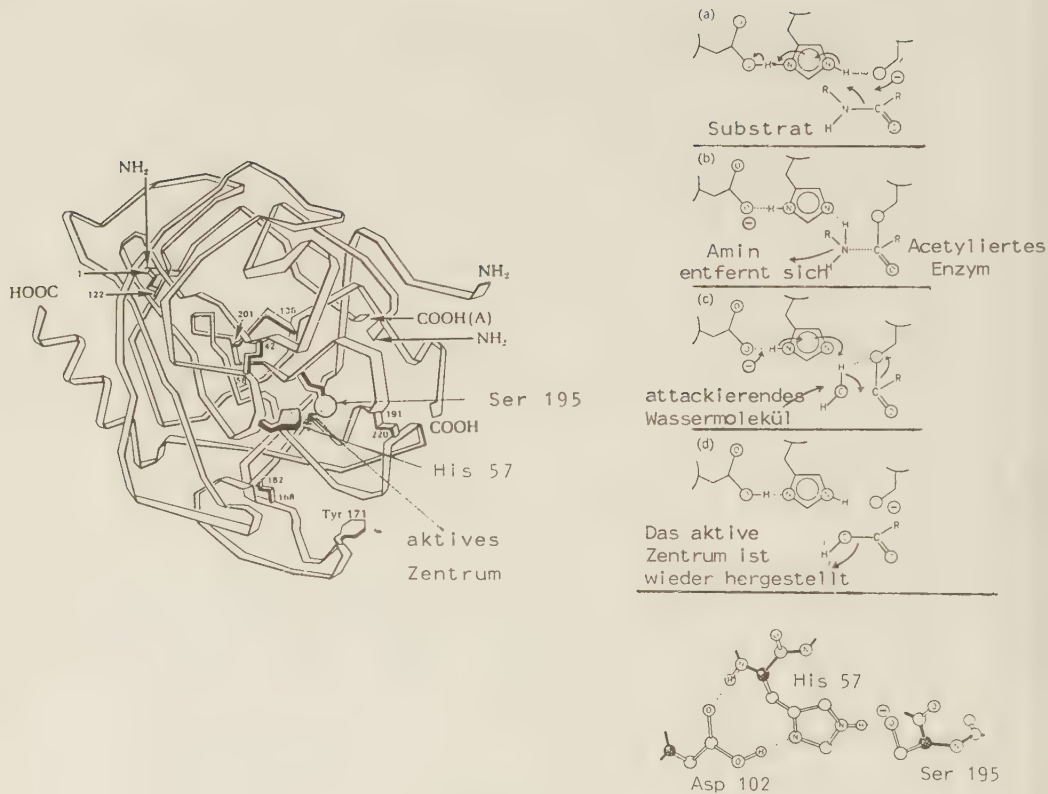


Abb. 22 Struktur und Wirkung von Chymotrypsin

Links : Dreidimensionales Modell der Polypeptidkette von Chymotrypsin nach röntgenanalytischen Daten. Histidin 57 und Serin 195 sind katalytisch aktive Einheiten (40).

Rechts: Spaltung einer Polypeptidkette durch Chymotrypsin (43).

Da der Übergang von der nativen zu der vollkommen ungefalteten Form - random coil - relativ leicht stattfindet, genügt schon die Spaltung einiger weniger stabilisierender Wechselwirkungen

- z.B. durch chemische oder physikalische Vorgänge - zur Auf-faltung des gesamten Moleküls.

Zu einer PHYSIKALISCHEN DENATURIERUNG führen insbesondere pH-WERT-VERSCHIEBUNGEN, TEMPERATUR und DRUCKBELASTUNG (24/40/44/45).

Zwar ist die Inaktivierung von Enzymen durch derartige Prozesse in wäßrigem Medium genau beschrieben (45/46/47/48), über die Zersetzung eines in Pulverform vorliegenden Enzymgemisches, wie dem Pankreatin, durch Temperatur- oder Druckerhöhung, ist allerdings wenig bekannt.

GRAF und SAKR führten nach einer 1979 erschienenen Veröffentlichung (6) die Inaktivierung auf die dabei AUFTRETENDEN TEMPERATUREN von ca. 313 K (40 °C) zurück. HÜTTENRAUCH (8), HORIKOSCHI (49) und NADA (9) diskutierten den Einfluß MECHANISCHER PROZESSE auf die Enzymaktivität. Während HÜTTENRAUCH eine Zersetzung durch einwirkende Scherkräfte postuliert, sehen HORIKOSCHI und NADA die Ursache für die Inaktivierung in dem Preßdruck. Die Aussagen stützen sich nur auf relativ wenige experimentelle Befunde, so daß es Ziel erster Untersuchungen sein sollte, die Zersetzungs kinetik von Pankreatin bei

- thermischer,
- druckbedingter und
- tribomechanischer Denaturierung

durch systematische Versuche zu bestimmen.

Als Leitenzym für die Untersuchungen wurde die α -Amylase gewählt, weil sie

- a) gegenüber thermischen und mechanischen Einflüssen empfindlicher ist als die Proteasen,
- b) thermisch instabiler ist als die Lipase (6/50/51),
- c) im Schweinepankreatin etwa 5 mal mehr Amylase (13 %) vorkommt als Lipase (2,5 %) und somit auftretende Strukturveränderungen besser erkannt werden können (26),
- d) im Gegensatz zu Lipase und Proteasen in Phosphat-Puffer vollständig löslich ist (26),
- e) analytisch gut erfaßbar ist:

- Die F.I.P.-Methode gestaltet sich einfach und liefert gut reproduzierbare Ergebnisse.
- In der Gelelektrophorese kann man mittels einer speziellen Färbemethode die Untereinheiten des oligomeren Enzyms sichtbar machen (52).

3.2. Thermische Zersetzung

3.2.1. Versuchsdurchführung

Um die Zersetzungskinetik für Pankreatin bei Temperaturbelastung bestimmen zu können, mußte das Proteingemisch auf Temperaturen bis zu 373 K (100 °C) erwärmt und während einer Dauer von max. 60 Minuten bei diesen Temperaturen belassen werden. Im Hinblick auf konstante Versuchsbedingungen und die zu fordernde Reproduzierbarkeit wurde eine in Abbildung 23 skizzierte Apparatur konzipiert. Pankreatin wurde dazu in ein wasserdichtes Vial abgefüllt und im Wasserbad erwärmt. Die Temperatur des Pulvers konnte kontinuierlich mittels eines eingeführten Thermoelements aufgezeichnet werden. Dabei zeigte sich, wie auch aus den errechneten Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten hervorgeht, daß die Zeit für den Temperatúrausgleich Wasser → Vial → Luft → Pulver äußerst kurz war. Nach der Temperaturbelastung wurde die Amylaseaktivität bestimmt.

1. Wasserbad
2. Wasserdichtes Vial mit Pankreatin
3. Philips Thermocoax Miniatur-Thermoelement CA 45500
4. Heidolph-Motor
5. Philips Miniaturschreiber PR 2400A

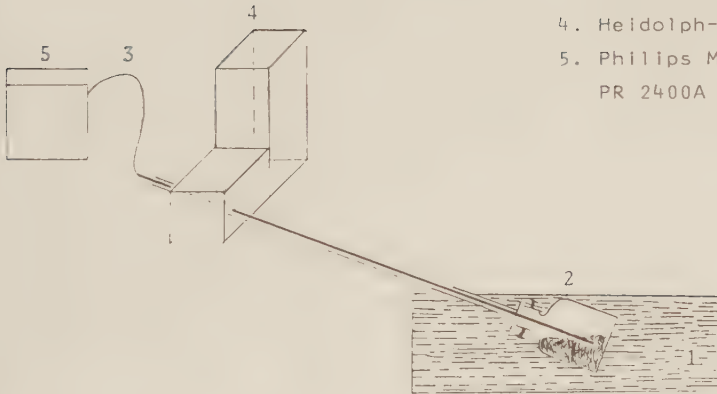


Abb. 23 Apparatur zur kontrollierten, trockenen Erwärmung von Pankreatin auf definierte Temperaturen.

3.2.2. Ergebnisse

Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, war die Amylase bis zu einer Temperatur von 333 K (60 °C) während der Prüfdauer von 60 Minuten stabil. Bei höheren Temperaturen zersetzte sich das Enzym EXPONENTIELL nach einer REAKTION ERSTER ORDNUNG (48/9).

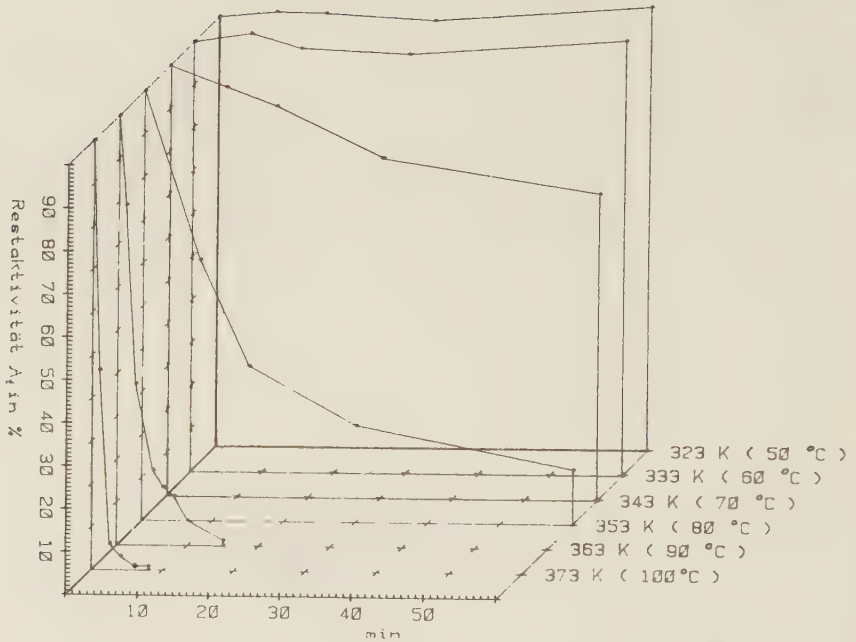


Abb. 24 Thermische Inaktivierung von α -Amylase aus Pankreatin in Abhängigkeit von Temperatur und Belastungszeit (Ausgangsaktivität: 34,6 FIP-E/mg)

Für die Zersetzungsgeschwindigkeit gilt demnach:

$$v = - \frac{dA_t}{dt} = k \cdot A_t \quad \text{Gl. 2}$$

Nach Integration und Umrechnung ergibt sich:

$$\log A_t = \log A_0 - \frac{k \cdot t}{2,303} \quad \text{Gl. 3}$$

A_0 : Aktivität der Ausgangssubstanz

A_t : Aktivität zum Zeitpunkt t

t : Belastungszeit

k : Zersetzungsgeschwindigkeitskonstante

d.h. trägt man $\log A_t$ gegen t auf, so erhält man eine Gerade

mit der Steigung $-\frac{k}{2,303}$ und den Ordinatenabschnitt $\log A_0$ (Abbildung 25).

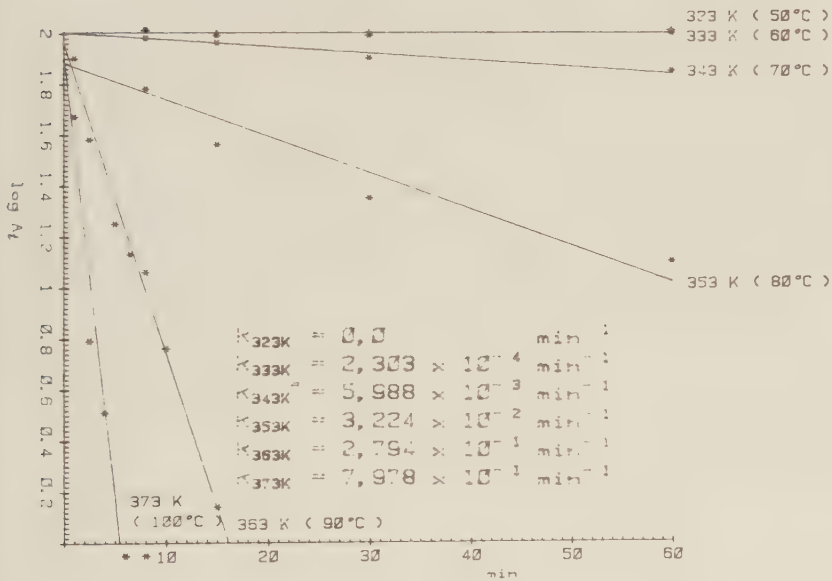


Abb. 25 Thermische Inaktivierung der α -Amylase

Aus der Steigung der Geraden kann man somit die Geschwindigkeitskonstanten berechnen (siehe Abbildung 25), deren Temperaturabhängigkeit die Arrheniusgleichung beschreibt:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}} \quad \text{Gl. 4}$$

mit

k : Zersetzungsgeschwindigkeitskonstante

T : absolute Temperatur

R : relative Gaskonstante ($8,3143 \text{ J/K mol}$)

E_A : Aktivierungsenergie, die die Moleküle besitzen müssen, um reagieren zu können

A : Häufigkeitsfaktor oder praeexponentieller Faktor.
Er ist ein Maß für die Aktivierungsentropie ΔS .

Nach Integration erhält man:

$$\log k = \log A - \frac{E_A}{2,303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T} \quad \text{Gl. 5}$$

Bei graphischer Darstellung von $\log k$ gegen $1/T$ (siehe Abbildung 26) ergibt sich für die Zersetzung der α -Amylase eine Gerade mit der Steigung $-E_A/2,303 \cdot R$ und dem Achsenabschnitt $\log A$ (Abbildung 26) ($28/30/53/54/55$).

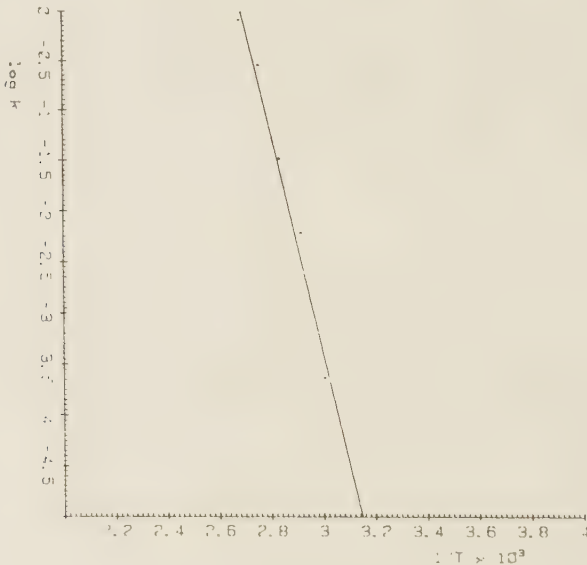


Abb. 26 Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten von α -Amylase bei rein thermischer Inaktivierung - im Arrhenius-Diagramm.

Bei der thermischen Zersetzung der α -Amylase läuft demnach eine einheitliche Reaktion - keine Parallelreaktionen - ab.

Aus Gleichung 5 ist über die Steigung der Geraden die AKTIVIERUNGSENERGIE für die Zersetzung zugänglich. Im vorliegenden Fall ergibt sich:

$$E_A = 210 \text{ kJ/mol}$$

Dieser Wert liegt wesentlich höher, als jene für typische chemische Zersetzungsreaktionen von Arzneistoffen, wie Photolyse (10 kJ/mol) oder Solvolyse (80 kJ/mol) (55). In der Größenordnung von 200 kJ/mol liegen pyrolytische Zersetzungsreaktionen, die hier aber nicht in Frage kommen.

Vergleicht man die Aktivierungsenergien für die Denaturierung von Proteinen (Trypsin, Chymotrypsin) mit dem gefundenen Wert, so zeigt sich, daß alle Aktivierungsenergien im Bereich zwischen 200 und 500 kJ/mol liegen (56). Diese hohen Reaktionswärmen sind ein Hinweis dafür, daß im Augenblick der Denaturierung eine Vielzahl von intramolekularen Wechselwirkungen aufgehoben wird.

Es fiel auf, daß thermisch belastetes Pankreatin mehr oder minder starke Farbtensivierungen nach Braun aufwies. Ob ein quantitativer Zusammenhang zwischen dem Grad der Verfärbung und der Amylaseinaktivierung besteht, konnte aus der Literatur nicht entnommen werden, so daß entsprechende Untersuchungen nötig waren.

3.2.3. Reflexionsphotometrische Untersuchungen von thermisch belastetem Pankreatin

Ursachen der Verfärbung

Braunfärbungen von Proteinen sind in der Literatur bei den verschiedensten Prozessen beschrieben. So stellten z.B. WITTGENSTEIN und BERRY (57) bei ihren Untersuchungen zur hautbräunenden Wirkung von Dihydroxyaceton fest, daß dieser Aldehyd mit den verschiedensten Aminosäuren unter Gelb- bzw. Braunfärbung reagiert.

Eine derartige Verfärbung beobachteten auch GRAF und SAKR (50) bei der Lagerung von Pankreatintabletten, die Emdex[®] enthielten. Die Autoren führten diese Verfärbung auf die Reaktion von Aldehydgruppen der im Hilfsstoff enthaltenen Glucose mit den Aminogruppen der Proteine, also auf eine Maillard-Reaktion, zurück.

Eigene Untersuchungen

Im Zuge der experimentellen Arbeiten wurden Verfärbungen bei folgenden Arbeitsprozessen festgestellt:

1. Erhitzen von Pankreatin auf verschiedene Temperaturen.
2. Direktverpressung von reinem Pankreatin.
3. Trockengranulation von Pankreatin auf Walzenpressen.
4. Verpressen von Trockengranulat.
5. Granulieren des Pankreatins mit Isopropanol/Wasser und Hordentrocknung bei 323 K (50 °C).
6. Lagerung geruchsstoffhaltiger Pankreatintabletten.

:: Emdex = Celutab = Maltodextrin

Da bisher von den verschiedenen Autoren der Verfärbungsgrad nur visuell und damit subjektiv beschrieben wurde, sollte die quantitative Erfassung mit Hilfe einer reflexionsphotometrischen Messanordnung erfolgen. Dazu wurde ein Chromatogramm-Spektralphotometer KM3 (C. ZEISS) mit angeschlossenem Tisch-Integrator eingesetzt (58).

Grundlagen der Messung

Bei SPEKTRALPHOTOMETRISCHEN REFLEXIONSMESSUNGEN von Verfärbungen pankreatinhaltiger Zubereitungen erhält man eine meßbare Absorption bei 405 und 436 nm (Abbildung 27); eingestrahlt wird mit dem Licht der Quecksilberdampflampe.

Betrachtet man im Vergleich dazu das Absorptionsspektrum einer wäßrigen Pankreatinlösung, so zeigt dieses eine Schulter bei 405 nm. Sind die wäßrigen Lösungen aus verfärbtem, geschädigtem Pankreatin hergestellt, so ist diese Schulter mit zunehmendem Verfärbungsgrad immer weniger ausgeprägt. Die spektralphotometrische Remissionsmessung von Pankreatin erfolgte daher bei 405 nm.

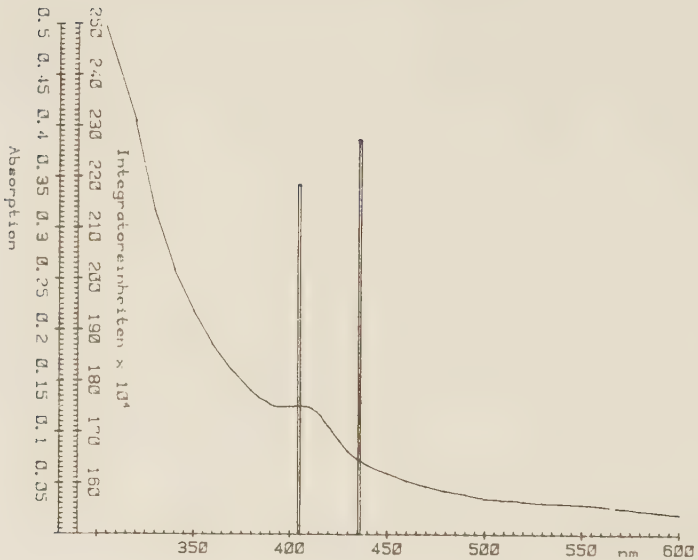


Abb. 27 Absorptionsspektrum einer Pankreatin-Lösung (Ausgangsaktivität: 34,6 FIP-E/mg) - hergestellt aus einer 1proz. Pankreatin-Suspension. Ferner sind die Messwerte von unterschiedlich verfärbten Nutrizymkomprimaten, gemessen mit einem DC-Spektralphotometer KM 3 bei 405 und 436 nm, mit aufgeführt. Näheres siehe Text.

Meßanordnung

Die zu bestimmenden Pankreatinzubereitungen - Tabletten oder Pulver - wurden in Vertiefungen einer weißen PVC-Platte eingelegt, wobei die Meßfläche 97,6 mm² betrug. Analog eines Dünnschichtchromatogramms wurde die PVC-Platte auf den Meß-

tisch gelegt, welcher die Platte mit einer konstanten Geschwindigkeit am Spalt vorbei bewegte. Bei gleichbleibender Tischgeschwindigkeit resultierten Peaks, deren Höhe mit der Absorption, d.h. der Verfärbung korrelierte. Eine quantitative Auswertung erfolgte durch Integration (Abbildung 28).

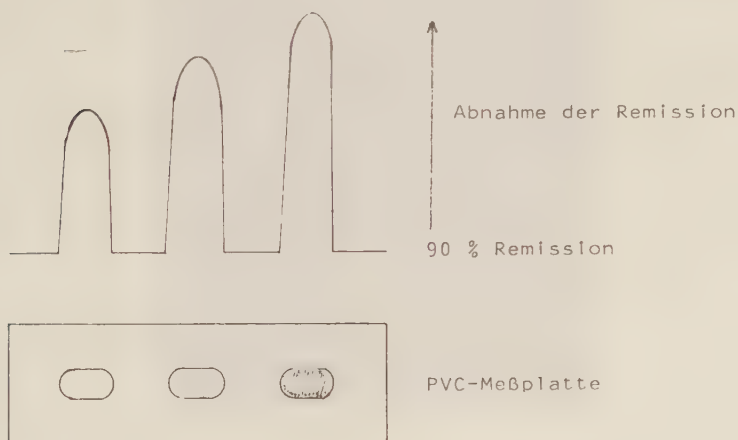


Abb. 28 Schematische Darstellung der Reflexionsmessung

Die erhaltenen Integratoreinheiten waren proportional zur Verfärbung: Höhere Integratoreinheiten entsprechen einer intensiveren Verfärbung.

Abbildung 29 zeigt die REMISSION einer bei der Trockengranulation anfallenden Schülpe (Kompaktling) mit unterschiedlicher Verfärbung.

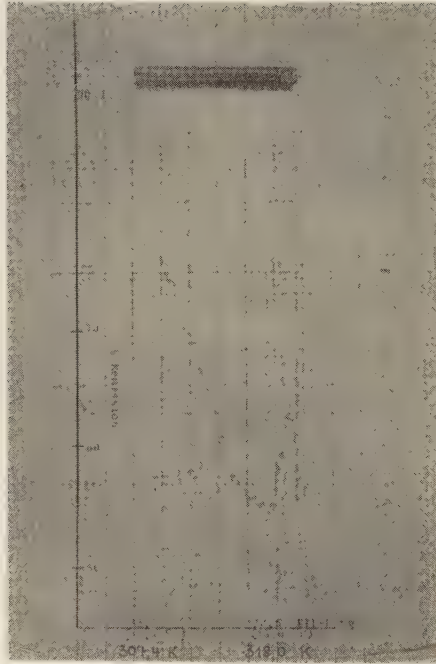


Abb. 29 Remission einer bei der Trockengranulation mit einem HUTT-Kompaktor anfallenden Schülpe mit unterschiedlicher Verfärbung. Die Amylaseaktivität des dunkleren Bezirks lag um ca. 10 % niedriger als die des hellen.

Die Temperaturen der Schülpen konnten berührungslos mit einem Infrarot-Spektralpyrometer simultan gemessen werden. Es traten Temperaturen von 308 K (35 °C) für die helle linke Seite und von 318 K (45 °C) für den dunklen Bezirk auf. Die Temperatureinwirkung als alleinige Ursache für die Verfärbung ist angesichts der relativ niedrigen Temperaturen nicht vorstellbar, was auch später beschriebene Versuche bestätigten. Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, daß außer der Temperatureinwirkung eine Preßkraft von ca. 10 bis 20 kN für die

Kompaktierung notwendig war, muß das Zusammenwirken beider physikalischer Größen als Ursache für die auftretende Farbinintensivierung angesehen werden. Parallel zur Verfärbung konnte eine Enzyminaktivierung beobachtet werden - heller Bezirk: - 4,6 % / dunkler Bezirk: - 11,8 %.

Ein weiterer Beweis für diese Interpretation ist die Beobachtung, daß bei rein thermischer Belastung eine Verfärbung erst bei Temperaturen über 333 K (60 °C) auftritt.

Abbildung 30 zeigt den Zusammenhang zwischen Verfärbungszunahme und Aktivitätsverlust als Folge einer thermischen Belastung mit Temperaturen zwischen 323 K (50 °C) und 373 K (100 °C). Obwohl die Beziehung nicht linear verläuft, so zeigt sich doch, daß die Verfärbung mit der Amylaseaktivität korreliert (Korrelationskoeffizient für lineare Regression: 0,92).

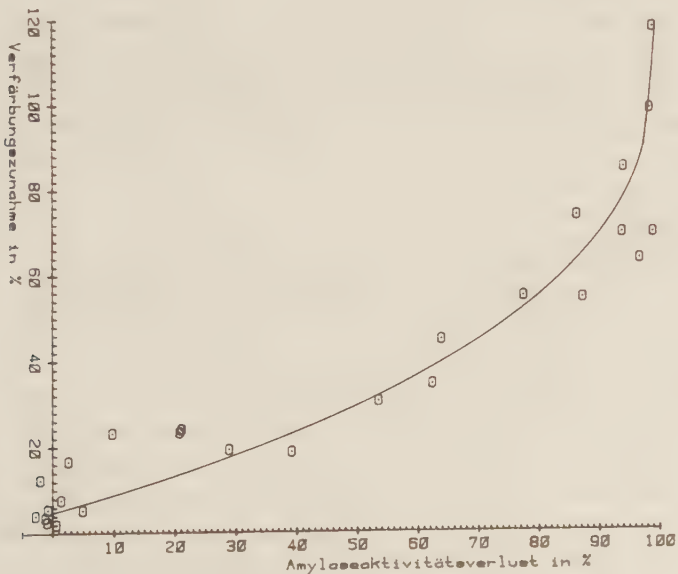


Abb. 30 Zusammenhang zwischen α -Amylaseaktivitätsverlust und Verfärbungszunahme bei rein thermischer Belastung von Pankreatin.

Diskussion

Tempert man Pankreatin auf 333 K (60 °C) und höher, tritt eine Veränderung des Proteingemisches auf. Es resultiert eine Enzyminaktivierung und parallel eine Verfärbung. Wirkt zu gleicher Zeit eine Preßkraft ein, so treten Farbänderungen bereits bei wesentlich niedrigeren Temperaturen auf (ca. 318 K/45 °C). Eine Farbtintensivierung hängt offensichtlich auch von der Art der jeweils einwirkenden Kraft ab, da bei Modellversuchen, bei denen in einer Kugelmühle ohne zusätzliche Erwärmung, selbst nach 100 Stunden, zwar keine Verfärbung, aber eine deutliche Aktivitätsabnahme festgestellt wurde.

Somit treten Farbtintensivierungen entweder durch höhere Temperaturen (343 K/70 °C bis 373 K/100 °C) oder bei niedrigen Temperaturen (313 K/40 °C) unter der Prämisse einer gleichzeitigen Krafteinwirkung auf.

Verfärbungen als Anzeichen für eine Enzymdenaturierung sind nur dann nachzuweisen, wenn es bei der Inaktivierung zu thermischen Prozessen kommt. Bei rein mechanischer Belastung hingegen tritt eine Inaktivierung auch auf, ohne daß sich Pankreatin dabei verfärbt.

3.3. Zersetzung bei mechanischer Beanspruchung

3.3.1. Inaktivierung durch Druckeinwirkung

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen mußte die Bedeutung des ANGEWANDTEN PRESSDRUCKS (8/9/49) für die Enzyminaktivierung genauer untersucht werden. Dazu wurde Pankreatin auf einer HYDRAULISCHEN KBr-PRESSE (13 mm Werkzeuge/500 mg Tabletten) mit drei verschiedenen Preßdrücken und variierenden Druckhaltezeiten verpreßt. Anschließend wurde die Amylaseaktivität bestimmt (siehe Abbildung 31).

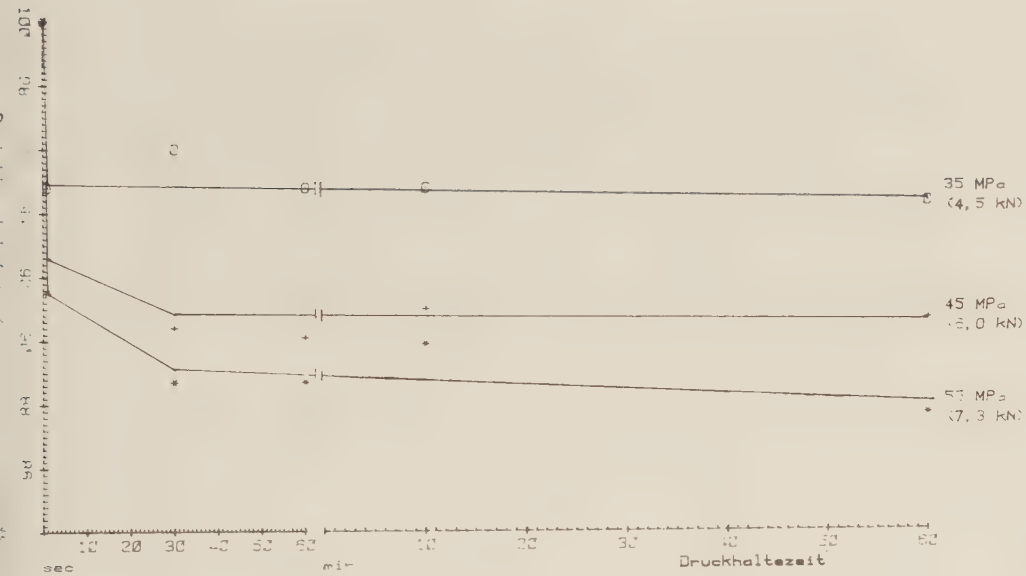


Abb. 31 Inaktivierung der α -Amylase bei verschiedenen Preßdrücken in Abhängigkeit von der Druckhaltezeit (Ausgangsaktivität: 35,1 FIP-E/mg).

Überraschend ist die Feststellung, daß die Aktivitätsverluste unter den gewählten Versuchsbedingungen im wesentlichen unabhängig von der Druckhaltezeit sind. Die Berechnung einer Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten als Funktion der Druckhaltezeit ist daher problematisch. Um einen Vergleich mit der rein thermischen und tribomechanischen Zersetzung zu erhalten, wurde sie nur für den Ein-Sekunden-Wert bestimmt (siehe Tabelle 4).

Alle auf der hydraulischen Presse erhaltenen Ergebnisse bestätigten sich bei der Tablettierung von Trockengranulat N auf einer VOLLINSTRUMENTIERTEN EXZENTERPRESSE - FETTE EXAKTA 1 (Oblong-Werkzeuge 9 x 15/500 mg Tabletten).

Mit Hilfe der Versuchsanordnung war es möglich, Preßkraft^{**} und Preßzeit auf Analogband exakt festzuhalten. Als Maß für die mechanische Beanspruchung wurde die KRAFT-ZEIT-KURVE (siehe 4.6.1.) für vier verschiedene Preßzeiten integriert. Bestimmte man nach der Verpressung die Enzymaktivität, so ergab sich, daß auch in diesem Fall die Amylaseinaktivierung unabhängig von der "KRAFTHALTEZEIT" war. Innerhalb einer Preßzeit von 0,09 sec erhält man eine Inaktivierung, die nur von der einwirkenden Preßkraft abhängig ist und mit zunehmender "Krafthaltezeit" nicht weiter zunimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3 α -Amylaseinaktivierung in Abhängigkeit von der Preßkraft (Preßdruck) und der Preßzeit bei Verpressung auf einer instrumentierten Exzenterpresse.

Preßkraft (kN)	7,8	6,7	7,8	7,6	11,2	12,1
Preßdruck (MPa)	65	56	65	63	93	100
Preßzeit (s)	6,6	0,24	0,15	0,09	0,16	0,08
AUC ^{***}	19,1	0,75	0,54	0,32	0,75	0,51
Amylaseaktivitätsverlust in %	-4,0	-4,0	-3,4	-5,4	-8,4	-8,7

*** AUC = Flächenintegral der Kraft-Zeit-Kurve

** Auf Tablettenmaschinen bestimmt man im allgemeinen die Preßkraft, die aufgebracht wird, um ein Material zu komprimieren. Der Preßdruck errechnet sich dann aus Preßkraft/Stempelfläche. Es gilt:

$$1 \text{ MPa} = 0,1 \text{ kN/cm}^2 = 10,197 \text{ kp/cm}^2$$

In Tabelle 4 sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Zersetzung bei der Tablettierung auf einer Exzenterpresse mitaufgeführt. Diese verläuft unter Realbedingungen wesentlich schneller als bei der Verpressung auf einer hydraulischen Presse.

Tabelle 4 Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten der pankreatischen α -Amylase bei mechanischer Inaktivierung durch Verpressung sowie bei Mahlung.

<u>HYDRAULISCHE PRESSE:</u>			<u>BELASTUNGSDAUER:</u>	
$k_{35 \text{ MPa}}$	= 5,3	10^{-2} s^{-1}	1	s
$k_{45 \text{ MPa}}$	= 7,6	10^{-2} s^{-1}	1	s
$k_{55 \text{ MPa}}$	= 9,0	10^{-2} s^{-1}	1	s
<u>EXZENTERPRESSE:</u>				
$k_{7,6 \text{ kN}}$	= 0,614	s^{-1}	0,09	s
$k_{12 \text{ kN}}$	= 1,152	s^{-1}	0,08	s
$k_{\text{Kugelmühle}}$	= 2,303	10^{-4} min^{-1}	100	h
$k_{\text{RETSCH-Mühle}}$	= 7,6	10^{-3} min^{-1}	1	h

Bei der hydraulischen Komprimierung von Pankreatin verfärbte sich das Ausgangsmaterial. Es konnte indessen weder eine statistische Abhängigkeit von dem Preßdruck noch von der Preßdauer nachgewiesen werden. Bei der Verpressung auf der Exzentermaschine traten keine Verfärbungen auf, da die Temperaturen nur um maximal 5 K erhöht waren.

3.3.2. Tribomechanische Zersetzung

Die Verdichtung eines Pulvers bei der Tablettierung erfolgt ungleichmäßig, d.h. es kommt zu SCHERUNGS- und REIBUNGSVORGÄNGEN, welche zu einer SPANNUNGSANISOTROPIE des Preßlings führen (49/59/60).

Inwieweit die spezifische Einwirkung von Scherungs- und Reibungsvorgängen eine Enzyminaktivierung bewirkt, sollte durch vergleichende tribomechanische Versuche geklärt werden. Dazu wurde zum einen in einer KUGEL-, zum anderen in einer RETSCH-MÖRSERMÜHLE bei Raumtemperatur gemahlen, da die einwirkenden Kräfte im ersten Fall durch SCHLAG und REIBUNG, und im zweiten Fall durch SCHERUNG charakterisiert sind. Nach verschiedenen Zeiten wurden Pankreatin-Proben entnommen und die Amylaseaktivität bestimmt. Abbildung 32 gibt die Werte in Abhängigkeit von der Mahldauer wieder.

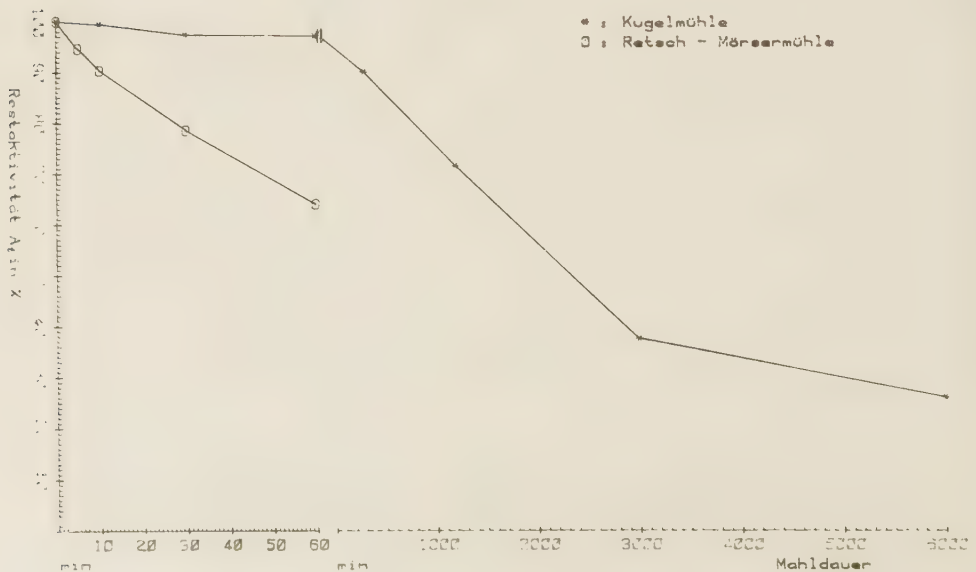


Abb. 32 Amylaseinaktivierung in Abhängigkeit von der Mahldauer. (Ausgangsaktivität: 35,0 FIP-E/mg).

In beiden Fällen gehorcht die ZERSETZUNG einer REAKTION ERSTER ORDNUNG. Die Geschwindigkeitskonstanten, die sich für die Vermahlung bestimmen lassen, sind in Tabelle 4 mitaufgeführt. Bemerkenswert ist, daß sich das Pankreatin während der Mahlung nicht verfärbt hat, d.h. temperaturbedingte Effekte, deren Auftreten bei Mahlprozessen von JUNGINGER (61) beschrieben wurde, dürften für die Inaktivierung nur von untergeordneter Bedeutung sein.

3.4. Diskussion der Ergebnisse

α -Amylase wird durch THERMISCHE, DRUCKBEDINGTE und TRIBOMECHANISCHE Beanspruchung inaktiviert, wobei die thermische und die tribomechanische Zersetzung nach einer Reaktion 1. Ordnung verlaufen. Ein Vergleich der Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten zeigt, daß die druckbedingte Inaktivierung wesentlich schneller abläuft als die thermische bzw. tribomechanische.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß bereits 1963 SUZUKI und KITAMURA (45) am Beispiel gelöster α -Amylase aus *Bacillus subtilis* nachwiesen, daß eine Enzyminaktivierung durch Druckeinwirkung (80 MPa, 293 K, pH 5,8) schneller erfolgt als bei Hitzeeinwirkung (348 K, pH 5,8). Die eingesetzte Versuchsanordnung war dadurch gekennzeichnet, daß in einem Polyvinylchlorid-Schlauch, der in thermostatisiertes Wasser von 293 K (20 °C) gebracht und einem definierten Druck ausgesetzt wurde, nur die druckabhängigen Verluste erfaßt wurden.

Wenngleich deren Ergebnisse und die anderer Autoren (62/63/64) an wäßrigen Proteinlösungen erhalten wurden, und die druckabhängige Zersetzung dabei nach einer Reaktion erster Ordnung verlief, können sie zum besseren Verständnis der Enzyminaktivierung bei der Tablettierung beitragen.

Für die Inaktivierung von Proteinen unter Druck, bei konstanter Temperatur gilt die Arrhenius-Gleichung in der Form:

$$\left(\frac{d \ln k}{d P} \right)_T = - \frac{\Delta V}{RT} \quad \text{Gl. 6}$$

mit k = Zersetzungsgeschwindigkeitskonstante

ΔV = Volumenänderung bei der Inaktivierung

Für ΔV gilt nach SUZUKI und TANIGUCHI (44)

$$\Delta V = (\bar{V} - V')$$

wobei V' das Volumen eines Mols nativen Proteins ist und $\bar{V}$ das Volumen eines Mols denaturierten ungefalteten Proteins.

Wirkt nun auf ein in wässrigem Medium gelöstes Protein ein Druck ein, so wird ΔV negativ, V' bleibt ungefähr gleich, $\bar{V}$ wird durch die engere Anordnung der H_2O -Moleküle kleiner und das Gleichgewicht



wird auf die rechte Seite verschoben.

Eine VOLUMENVERMINDERUNG - wenn auch anderer Genese - findet ebenfalls bei der VERPRESSUNG eines PULVERFÖRMIGEN PROTEINKOMPLEXES statt. Ein Maß für die Volumenverminderung nach Druckbelastung ist die SCHEINBARE DICHTe des Preßlings, welche durch Ausmessen der geometrischen Werte der Preßlinge bestimmt werden kann. Wäre die Volumenverminderung die Ursache für die Denaturierung, so müßte die Enzyminaktivierung mit der scheinbaren Dichte korrelieren. In der Tat ist dies, wie Abbildung 33 zeigt, der Fall.

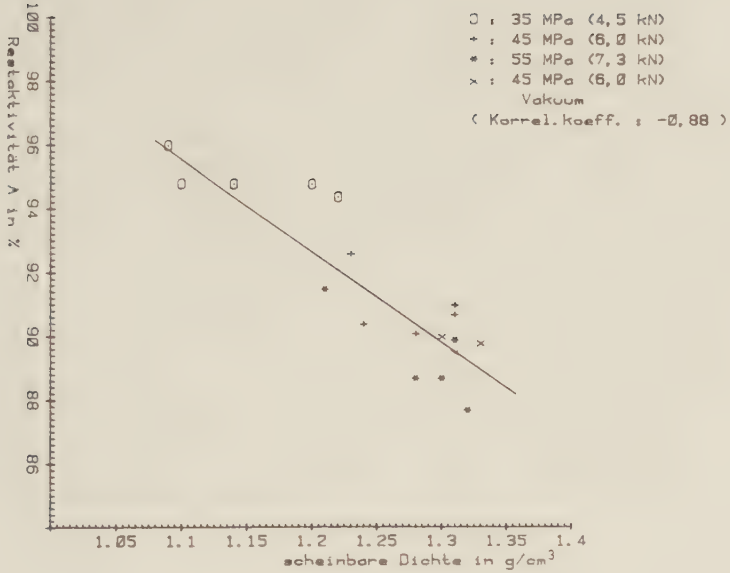


Abb. 33 α -Amylaseaktivität in Abhängigkeit von der scheinbaren Dichte der auf einer KBr-Presse hergestellten Komprimat.

Trägt man die scheinbare Dichte gegen die Druckhaltezeit auf, so erhält man auch eine Erklärung für die nur in der ersten Kompressionsphase stattfindende Denaturierung (Abbildung 34).

Insbesondere bei höheren Drücken ändert sich die scheinbare Dichte nach 60 s praktisch nicht mehr, d.h. Enzyme, die nicht innerhalb von 60 s inaktiviert werden, verändern sich auch anschließend nicht weiter.

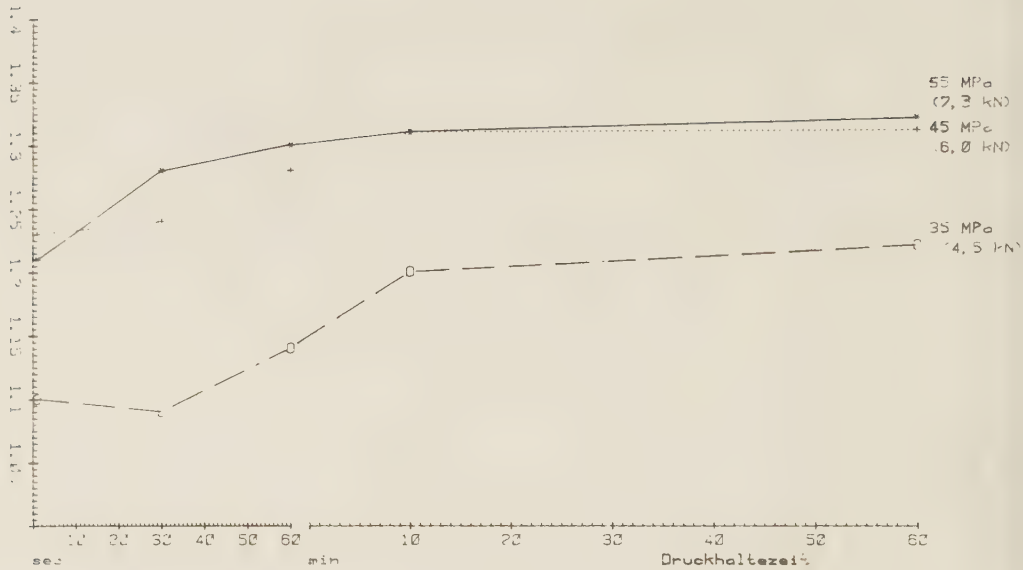


Abb. 34 Die scheinbare Dichte γ_{sch} der auf einer KBr-Presse bei verschiedenem Preßdruck hergestellten Preßlinge in Abhängigkeit von der Druckhaltezeit.

Die Bildung der Tablettenmatrix findet also bei üblichen Preßkräften nach kürzester Zeit statt. Die Ursache eines solchen Verhaltens muß in der PLASTISCH-ELASTISCHEN VERFORMBARKEIT eines Tablettierguts zu suchen sein. Nach REES und RUE (65) ist bei rein plastisch verformbaren Substanzen die Bildung der Tablettenmatrix nur von der Preßkraft und weniger von der Krafthaltezeit abhängig, bei elastisch verformbaren Materialien hingegen hat neben der Preßkraft auch die Krafthaltezeit einen wesentlichen Einfluß auf die Matrixbildung. Von den Autoren wurden unterschiedliche Tablettierhilfsmittel mit verschiedenen Preßkräften 0,17 und 10 s verpreßt und die scheinbare Dichte bestimmt. Für Emcompress, wasserfreie Lactose und NaCl war die plastische Verformung zwar von der

Preßkraft, nicht dagegen von der Krafthaltezeit abhängig. Bei Starax und Elcema hingegen war das elastische Verformungsverhalten von der Preßkraft und der Preßzeit abhängig.

Wie Abbildung 34 zeigt, ergibt sich bei 55 MPa für die scheinbare Dichte ein Grenzwert von $1,32 \text{ g/cm}^3$, der auch durch höhere Preßkräfte nicht überschritten wird. Eine VERPRESSUNG IM VAKUUM bei 45 MPa über 30, 60 und 300 s sollte zeigen, ob unter diesen Bedingungen die wahre Dichte des Pankreatins von ca. $1,42 \text{ g/cm}^3$ annähernd erreicht werden kann. Dabei ergab sich nur eine geringfügig höhere Dichte von $1,33 \text{ g/cm}^3$ *. Dementsprechend erhält man auch eine wenig niedrigere Enzymaktivität als bei Verpressung unter Normaldruck (Abbildung 33).

Aufgrund dieser Befunde ist die Annahme gerechtfertigt, daß die Inaktivierung eines in Pulverform vorliegenden Proteingemisches im Zusammenhang mit einer Volumenverminderung gesehen werden muß.

Dennoch dürfen thermische und tribomechanische Zersetzungsprozesse nicht unberücksichtigt bleiben; dies insbesondere unter der Prämisse, daß es bei der Tablettierung von makromolekularen Substanzen zu Scherungen und Brüchen (59/60/66) kommen kann. Nach Literaturangaben sollen an Bruchstellen kurzfristig (ca. 10^{-3} s) Temperaturspitzen von ca. 10^3 K - an sogenannten hot spots - auftreten (66), was zu Enzymschädigungen führen müßte. Inwieweit derartige temperaturinduzierte Vorgänge bei der Tablettierung von Pankreatin zu einer Enzymschädigung führen, mußte das Ziel weiterführender Untersuchungen sein.

* Wie spätere Untersuchungen mit Rundläuferpressen zeigten, ändert sich die WAHRE DICHTe von Pankreatinpreßlingen auch bei Anwendung hoher Preßkraft nicht.

4. Tablettierung von Pankreatin

4.1. Theorie des Kompressionsprozesses

Bei der KOMPRIMIERUNG muß der sich abwärts bewegende Oberstempel Kräfte überwinden, die das Tablettiergut der VERDICHUNG entgegensetzt. Trägt man den Kraftverlauf gegen den Stempelweg auf, erhält man bei der Verpressung das in Abbildung 35 dargestellte Kraft-Weg-Diagramm.

Mittelwert aus 5 Pressungen

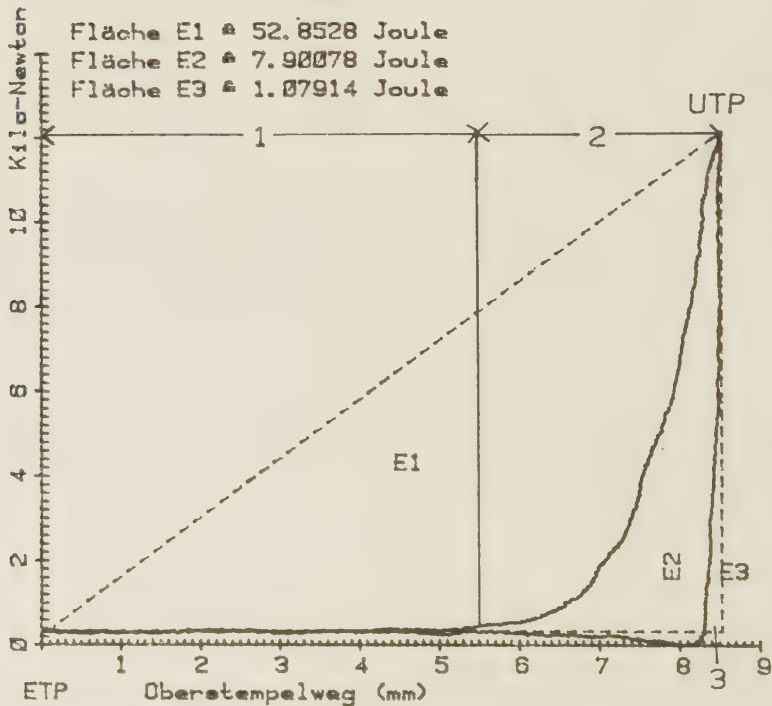


Abb. 35 Vom Prozeßbrechener erstelltes Kraft-Weg-Diagramm für Trockengranulat N, verpreßt auf einer FETTE Exakta 1-Exzenterpresse.

Anhand dieses Diagramms kann man den dynamischen Kompressionsprozess von Pulvern und Granulaten - auf einer Exzenterpresse - in folgende Abschnitte unterteilen (67):

1) Vorkompressionsphase

Das Tablettiergut wird vom Oberstempel bis zu einer bestimmten Packungsdichte ohne nennenswerten Arbeitsaufwand zusammengeschoben.

2) Kompressionsphase

Nun kommt es zu einem annähernd hyperbolischen Kraftanstieg (68). Dabei werden die Teilchen zuerst elastisch verformt. Dieser elastische Deformationsbereich von Feststoffen ist klein und wird rasch durchlaufen. Bei weiterer Druckeinwirkung verformen sich die Partikel irreversibel; sie fließen plastisch, im Fall spröder Materialien kommt es zum Bruch und bei elastisch verformbaren Tablettierstoffen tritt eine mehr oder weniger ausgeprägte Verformung ein (69/70).

3) Kraftabfall

Durchläuft der Oberstempel den unteren Totpunkt (UTP), so fällt die Kraft steil ab. Dabei wird die im Preßling gespeicherte elastische Energie an den Oberstempel zurückgegeben.

Über das erstellte Kraft-Weg-Diagramm erfolgt auch die energetische Auswertung der Tablettenbildung. Man unterscheidet die Flächen E_1 , E_2 und E_3 (71/72/73/68).

- E_1 ergibt sich aus $E_{\text{gesamt}} - E_2 - E_3 = E_1$. Sie hat aber nur fiktiven Charakter und somit keine Bedeutung für die Tablettenbildung.

- Die FLÄCHE E_2 , die von dem Kurvenzug umschrieben wird, entspricht der in der Tablette bei der Komprimierung UMGESetzten MECHANISCHEN ENERGIE, d.h. sie beschreibt den zur Bildung des Komprimats aufgewendeten Energiebeitrag.
- Die TEILFLÄCHE E_3 kennzeichnet diejenige Energie, die vom Preßling nach der Entspannung wieder an die Maschine abgegeben wird; E_3 dient als Maß für die Elastizität einer tablettierten Substanz. Man erhält sie, wenn man vom unteren Totpunkt UTP das Lot auf die Abszisse fällt.
Darüber hinaus sehen F. MÜLLER und SCHIERSTADT (74) in der Fläche E_3 auch ein Maß für die elastische Verformungsarbeit, die an der Tablettenmaschine und an den Stempelwerkzeugen während der Tablettierung geleistet wird.

FÜHRER und PARMENTIER (75) stellten bei ihren Arbeiten zur Thermodynamik der Tablettierung fest, daß 90 % der zur Verpressung MECHANISCH AUFGEWANDTEN ENERGIE in WÄRMEENERGIE umgewandelt wird. Dies hat zur Folge, daß - wie auch in unserem Arbeitskreis von HOPP (76) nachgewiesen werden konnte - Tabletten bei ihrer Herstellung nicht selten Oberflächen-Temperaturen von über 313 K (40 °C) erreichen. - An Bruchzonen können - wie schon erwähnt - in den sog. "hot spots" noch wesentlich höhere Temperaturen auftreten (77/66).

Ca. 10 % der mechanisch aufgewandten Energie verbleiben im Preßling. Diese Restenergie kann wie folgt aufgeschlüsselt werden:

- 1) Veränderung der spezifischen Oberfläche (ca. 1 % (78)).
- 2) Strukturelle Veränderung des Materials (< 1 % (79)).
- 3) Im Preßling verbleibende mechanische Energie.

Energiebeträge, die zu einer Veränderung der spezifischen Oberfläche bzw. der Materialstruktur führen, sind also sehr klein. Die Restenergie in Höhe von 10 % verbleibt als "VERSPANNUNGS-ENERGIE" im Preßling. Während der Lagerung wird diese zum Teil abgebaut und als Wärmeenergie wieder frei (75/80). Bei der Tablettierung kommt es also zu thermischen und mechanischen Veränderungen im Tablettiergut.

4.2. Herstellung von Pankreatintabletten

Wie im letzten Kapitel gezeigt werden konnte, unterscheiden sich die Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten bei thermischer und mechanischer Denaturierung von Pankreatin deutlich. Um entscheiden zu können, welcher Einfluß für die Inaktivierung bei der Verpressung maßgeblich ist, mußten im weiteren Verlauf die Verhältnisse in Praxis exakt untersucht werden. Hierzu wurde die Amylasedenaturierung - in Abhängigkeit von Preßkraft und Preßtemperatur - bei der TROCKENGRANULATION auf dem HUTT-KOMPAKTOR und bei der TABLETTIERUNG auf einer HOCHLEISTUNGS-RUNDLÄUFERPRESSE von Trockengranulat N*, einem im Handel befindlichen Pankreatinmaterial, bestimmt**.

**	Nutrizym-Granulat:	Pankreatin 6 x NF	80 %
		Fel tauri	6 %
		Talkum	
		Magnesiumstearat	
		Cellulosepulver	ad 100 %

** Für die Möglichkeit zur Versuchsdurchführung und für die großzügige Unterstützung bei den genannten experimentellen Arbeiten danke ich der Firma E. MERCK, Darmstadt.

4.2.1. Temperaturerhöhung und Aktivitätsverluste durch Trockengranulation

Angesichts der Tatsache, daß Pankreatin als voluminöses Pulver vorliegt und bei schnellaufenden Pressen infolgedessen die Dosierungsgenauigkeit nicht optimal ausfällt, wird in der industriellen Praxis häufig eine Granulation, insbesondere eine TROCKENGRANULATION, durchgeführt, so daß im Zuge dieses Prozesses KOMPRESSIONS- oder TEMPERATURBEDINGTE Enzymaktivitätsverluste auftreten.

Im einzelnen müssen bei folgenden Arbeitsvorgängen Denaturierungserscheinungen diskutiert werden:

1) Herstellung der Kompaktlinge (Schülpfen)

Granuliert man mit einem Hutt-Kompaktor, so werden Preßkräfte angewendet, die in der Größenordnung der Tablettenmaschinen, d.h. im Bereich von ca. 10 bis 20 kN liegen. Mit Denaturierungserscheinungen als Folge mechanischer oder thermischer Beanspruchungen ist zu rechnen.

2) Zerkleinerung der Kompaktlinge

Nach der Kompaktierung wurden die Preßstangen - z.B. in einer Fizz-Mill - zerkleinert, wobei oszillierende Schläger das Gut durch ein Sieb pressen. Da hierbei auftreten- de Scherkräfte ebenfalls zu einer Denaturierung führen können (siehe 3.3.2.), dürfen für diesen Arbeitsgang Enzymaktivitätsverluste nicht ausgeschlossen werden.

3) Lagerung des Granulats

Das zerkleinerte, zunächst 303 bis 313 K (30 bis 40 °C) warme Granulat wird in größeren Vorratsbehältern aufgefangen und kühlt in diesen unter Fabrikationsbedingungen normalerweise nur langsam ab. Obwohl in dieser Phase eine thermische Inaktivierung unwahrscheinlich ist, sollte auch dieser Einfluß während eines Beobachtungszeitraums von 1 Tag überprüft werden.

Tabelle 5 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Bei der Kompaktierung erhielt man Preßstangen, die bereits durch ihre mehr oder weniger stark ausgeprägte Braunfärbung auffielen (siehe Abbildung 28). Aus reflexionsphotometrischen Messungen kann geschlossen werden, daß die einwirkenden Kräfte zwischen 10 und 20 kN liegen dürften.

Tabelle 5 Herstellung von Nutrizym-Kernen:
Einfluß der Preßkraft und der Temperatur
auf die Amylaseaktivität.

P r o b e	Preßkraft in kN	Temperatur in Kelvin ($^{\circ}\text{C}$)	Amylaseaktivität in FIP-E/mg (Aktivitätsverlust)
unverarbeitete Tablettier- mischung	---	294 K (21 $^{\circ}\text{C}$)	34,7
<u>Granulation</u>			
Preßstangen	10 - 20	307,4-318 K (34,4-45 $^{\circ}\text{C}$)	31,8 (8,4 %)
dunkel		wärmer	30,6 (11,8 %)
hell		kälter	33,1 (4,6 %)
Trockengranulat		307,1 K (41,1 $^{\circ}\text{C}$)	31,7 (8,6 %)
Trockengranulat 1 Tag nach Her- stellung		293 K (20 $^{\circ}\text{C}$)	31,7 (8,6 %)
<u>Tablettierung</u>			
Preßlinge	20 UpM ca. 16,5	siehe Abbildung 14	29,3 (15,8 %)

Mittels eines IR-Spektralpyrometers konnte die Temperatur der die Walzen verlassenden Kompaktlinge berührungslos bestimmt werden. Es ergab sich eine höhere Temperatur bei den dunklen und eine geringere Temperaturerhöhung bei den helleren Preßprodukten. Amylaseaktivitätsbestimmungen erbrachten zwar im Mittel Rückgänge von 8,4 %; eine Aufschlüsselung der dunklen und hellen Kompaktlinge zeigte, daß das dunkle Material mit 11,8 % erheblich stärker denaturiert wurde.

Aus diesen Untersuchungen muß der Schluß gezogen werden, daß bei normalem Hutt-Kompaktor-Betrieb eine durchschnittliche Inaktivierung in der Größenordnung von 5 bis 10 % auftritt und daß erhöhte Preßtemperaturen mit Enzyminaktivierungen einhergehen.

Während bei der Kompaktierung also ein erheblicher Amylaseaktivitätsverlust auftrat, wurde das Enzym aber weder bei der anschließenden Zerkleinerung der Kompaktlinge noch bei der Lagerung des zunächst ca. 313 K (40 °C) warmen Granulats geschädigt. Der Umstand, daß durch den Zerkleinerungsprozeß keine Aktivitätseinbußen auftraten, ist auf die kurze mechanische Belastungsdauer zurückzuführen.

4.2.2. Tablettierung des Trockengranulats auf einer Hochleistungsrundläuferpresse

Zusätzlich zu den bei der Kompaktierung auftretenden Aktivitätsverlusten, muß eine weitere Enzyminaktivierung im Zuge der Tabletten- bzw. Drageekernherstellung unter Produktionsbedingungen berücksichtigt werden. Ausgeführt wurden diese Versuche auf einer Perfecta 3000-Presse der Firma W. FETTE, die mit Euronorm-Oblong-Stempeln ausgerüstet war (7,8 x 13,8 mm). Das Gewicht der Kerne betrug 500 mg.

Wenn man mit einer Preßkraft von 15 bis 17 kN (153 - 174 MPa) bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20 UpM arbeitet, so beobachtet man eine Inaktivierung von ca. 7 %, so daß ein Gesamtverlust - bezogen auf das Ausgangsmaterial - in Höhe von ca. 15 % resultiert (siehe Tabelle 5).

Im Rahmen dieser Arbeit bestand die Möglichkeit während eines längeren Zeitraums von ca. 4 Stunden die Temperaturentwicklung zu verfolgen. Wie in Abbildung 36 dargestellt, wurde außer der Entwicklung der Oberflächentemperatur der Komprimierte auch der Temperaturverlauf des Matritzentisches aufgezeichnet. Ferner ist die nach bestimmten Zeiten ermittelte Amylaseaktivität aufgeführt.

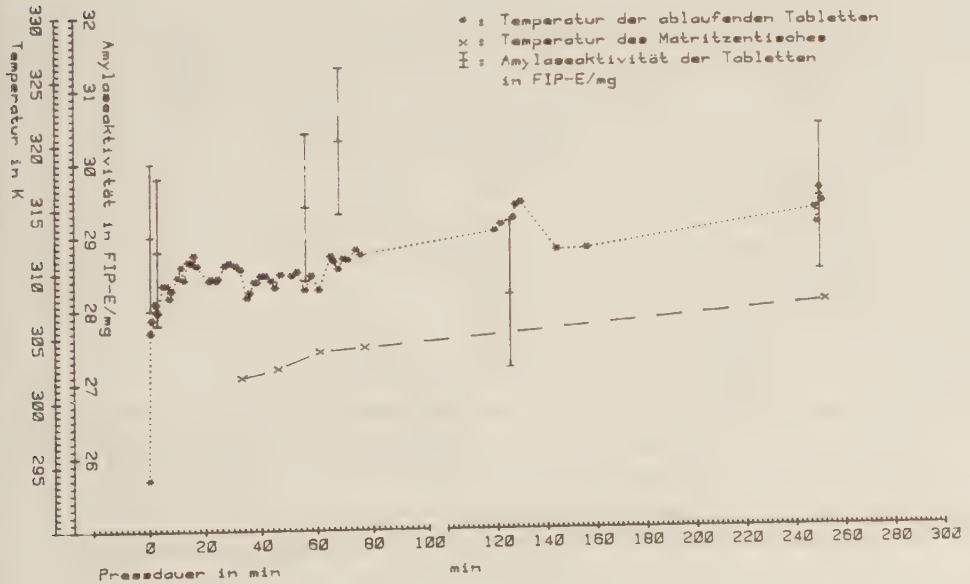


Abb. 36 Verpressung von Trockengranulat N (Amylaseaktivität: 31,7 FIP-E/MG) auf einer FETTE P 3000 mit einer durchschnittlichen Preßkraft von 16,5 kN und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 20 UpM.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bereits innerhalb der ersten Minuten die ablaufenden Komprimat eine Temperaturerhöhung von 15 K erfuhren und im Verlauf der weiteren Tablettierung nur noch ein Anstieg von ca. 6 K erfolgte. Parallel dazu entwickelte sich der Temperaturverlauf des Matrizentisches (Abbildung 36).

Auf die Amylaseaktivität hatte die im Verlauf der Verpressung beobachtete TEMPERATURERHÖHUNG KEINEN EINFLUSS; wenn man nämlich die Aktivitätsbestimmungen der nach verschiedenen Zeiten entnommenen Proben durchführt, so stellt man fest, daß die Einbußen der bereits nach einer Minute entnommenen Proben genau so hoch waren wie die später - z.B. nach 260 Minuten - entnommenen Tabletten. In allen Komprimatproben lagen sie ca. 7 % unter den Granulatausgangswerten.

Nur in einem Fall, nach 125 Minuten, wurde ein deutlicher Enzymaktivitätsabfall sowie eine Temperaturerhöhung beobachtet, was jedoch auf eine Überfüllung der Matrizen zurückgeführt werden konnte. Hier wurde bei gleicher Maschineneinstellung jeweils eine größere Masse komprimiert, was mit einer Erhöhung von Preßkraft und Temperatur verbunden war.

4.2.3. Diskussion der Ergebnisse

Bei der Herstellung eines Pankreatinpräparates führen Trockengranulation und Tablettierung zu Amylaseaktivitätsverlusten in Höhe von zusammen ca. 15 %. Die bei der Verarbeitung auftretenden Temperaturen liegen etwa bei 313 K (40 °C). In welchem Maße die Temperaturerhöhung für die Enzyminaktivierung verantwortlich ist, kann aufgrund der bis jetzt vorliegenden Daten nicht hinreichend abgeleitet werden.

Folgende Beobachtungen stehen im Widerspruch zueinander:

- Bei der Kompaktierung treten mit erhöhter Temperatur auch stärkere Aktivitätsverluste auf.
- Eine vorübergehende Lagerung des Trockengranulats bei erhöhter Temperatur führt zu keinem weiteren Aktivitätsabfall.
- Eine Erhöhung der Preßtemperatur im Laufe einer vierstündigen Tablettierung von 309 K (36 °C) auf 315 K (42 °C) wirkt sich ebenfalls nicht auf die Enzyminaktivierung aus.

Eine Erklärung für den Sachverhalt kann aus der bei der Tablettierung nach 125 Minuten aufgetretenen Erscheinung abgeleitet werden (siehe Abbildung 36). Sie beruhte auf einer "Überpressung", d.h. einem Anstieg der effektiven Preßkraft, welcher zu einer Temperaturerhöhung der Preßlinge um ca. 3 K und zugleich zu einem erhöhten Amylaseaktivitätsverlust führte (76/81/82). Während also bei einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von ca. 6 K keine weitere Schädigung auftritt, beobachtet man bei preßkraftbedingter Erhöhung um weitere ca. 3 K einen überproportionalen Aktivitätsverlust. Daraus kann die DOMINIERENDE BEDEUTUNG DER PRESSKRAFT FÜR DIE ENZYSCHÄDIGUNG gefolgert werden.

Nun waren systematische Versuche unter definierter Preßkraft-erhöhung notwendig, für die eine instrumentierte Exzenterpresse eingesetzt werden mußte. Ein weiteres Ziel sollte die genauere Untersuchung der thermischen und mechanischen Einflüsse auf die Tabletteneigenschaften sein.

4.3. Tablettierung auf Exzenterpressen

4.3.1. Verpressung bei Raumtemperatur auf einer instrumentierten Tablettenpresse

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte zunächst geklärt werden, inwieweit bei Pankreatinpreßlingen die Temperaturerhöhung von der Preßkraft abhängig ist.

Dazu wurde auf einer voll instrumentierten Exzenterpresse (FETTE HANSEATEN EXACTA 1) bei Zimmertemperatur Pankreatin mit 12 mm-Werkzeugen zu 450 mg-Tabletten verpreßt. An die Exzenterpresse war ein Hilfsmotor angeschlossen, um die Tablettiergeschwindigkeit beliebig langsam einstellen zu können. Die Tablettiergeschwindigkeit wurde so gewählt, daß abgeschaltet werden konnte, sobald der Preßling vom Unterstempel auf den Matrizenstisch gehoben wurde. In dieser Position erfolgte die berührungslose Temperaturmessung mittels eines IR-Spektralpyrometers.

Ergebnisse

Dabei wurden folgende Resultate erhalten:

Tabelle 6 Temperaturerhöhung und Amylaseinaktivierung
in Abhängigkeit von der Preßkraft (Exzenter-
presse FETTE HANSEATEN EXACTA 1).

Preßkraft in kN bei 3 Hub/min. (Preßdruck MPa)		Temperaturerhöhung wäh- rend der Verpressung ΔT	Amylaseaktivität (FIP-E/mg) (Aktivitätsverlust)	
1)	3,0 (27)	1,0 K		
2)	3,7 (33)	1,3 K		
3)	4,5 (40)	1,6 K		
4)	6,7 (60)	2,3 K		
5)	8,9 (79)	3,1 K	33,9	(0 %)
6)	10,7 (95)	3,8 K		
7)	11,9 (105)	4,0 K	33,0	(2,4 %)
8)	17,4 (154)	5,5 K		
9)	18,2 (161)	6,0 K	31,8	(6,2 %)
Ausgangsmaterial			33,9	

Trägt man ΔT gegen die Preßkraft auf, so zeigt sich, daß die Temperaturerhöhung zur Preßkraft direkt proportional ist (Abbildung 37).

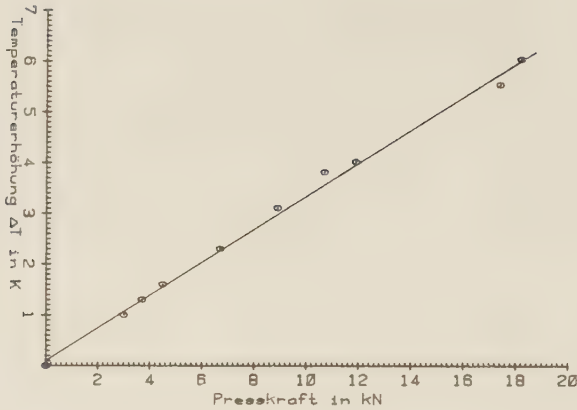


Abb. 37 Temperaturerhöhung von Pankreatinpreßlingen in Abhängigkeit von der Preßkraft, gemessen mit einem IR-Spektralpyrometer, Exzenterpresse FETTE HANSEATEN EXACTA 1 (3 Hub/min.).

Auffällig ist die Tatsache, daß die an der Tablettenoberfläche gemessene Temperaturerhöhung unter den gewählten Versuchsbedingungen nur wenige Kelvin betrug.

Die Enzymaktivität wurde bei den Versuchen 5, 7 und 9 überprüft. Aus Tabelle 6 sind die erhaltenen Werte zu entnehmen.

Trägt man die Enzymaktivität gegen die Preßkraft bzw. die Temperaturerhöhung auf, erhält man fast identische Kurven, was aufgrund der Linearität von Preßkraft und Temperaturerhöhung auch nicht anders zu erwarten war (Abbildung 38 und 39).

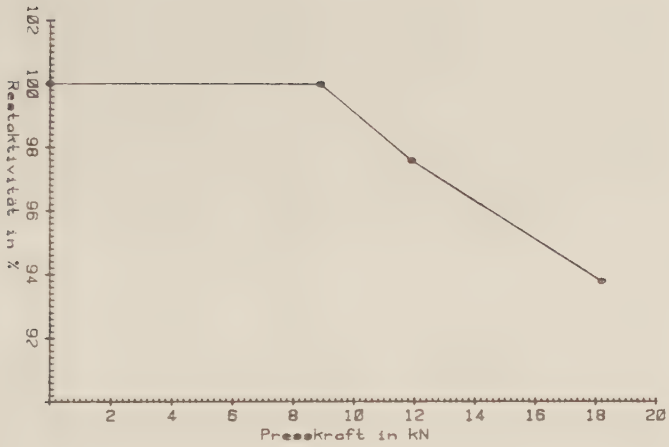


Abb. 38 Abhängigkeit der Amylaseaktivität von der Preßkraft. FETTE HANSEATEN EXACTA 1 (3 Hub/min.).

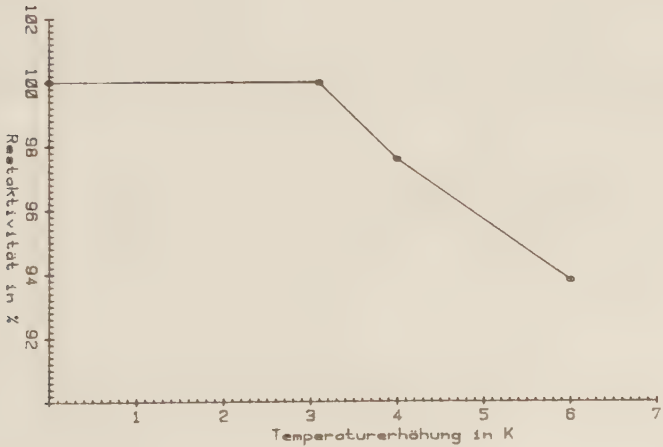


Abb. 39 Abhängigkeit des Amylaseaktivitätsverlustes von der Temperaturerhöhung bei der Verpressung von Pankreatin. FETTE HANSEATEN EXACTA 1 (3 Hub/min.).

Bis zu einem Grenzwert der Preßkraft in Höhe von 8,9 kN (79 MPa) ($\Delta T = 3,1$ K) findet somit keine Amylaseschädigung statt. Nun kann normalerweise nicht mit diesen relativ geringen Kräften tablettiert werden, da die resultierenden Komprimat eine unbefriedigende mechanische Widerstandsfähigkeit aufweisen. In Praxis werden aus diesem Grund bekanntlich Preßkräfte von > 15 kN (133 MPa) aufgewendet.

4.3.2. Tablettierung im Kühlraum

Nach den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche lag es nahe, Pankreatin auch im Kühlraum zu verpressen. Dazu wurde das Trockengranulat N auf einer KORSCH EK O-Exzenterpresse mit 12 mm-Werkzeugen zu Tabletten mit einem Einzelgewicht von 500 mg sowohl bei Zimmertemperatur als auch im Kühlraum bei 280 K (ca. 7°C) mit geringer und hoher Preßgeschwindigkeit und mit konstanter Preßkraft tablettiert.

Zwei Minuten lang wurde die Temperatur der ablaufenden Preßlinge mit dem IR-Spektralpyrometer gemessen. Anschließend wurden die Amylase-Aktivitäten bestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 7 Temperaturerhöhung und Amylaseaktivität bei verschiedenen Preßgeschwindigkeiten - Verpressung bei Zimmertemperatur und im Kühlraum (KORSCH EK 0-EXZENTERPRESSE) -.

Ausgangstemperatur	296,3 K (23,3 °C)	296,8 K (23,8 °C)	280,8 K (7,8 °C)	280,5 K (7,5 °C)
Hubeinstellung	23 Hub	48 Hub	23 Hub	37 Hub
Temperatur der ab- laufenden Tabletten	305,7 K (32,7 °C)	305,8 K (32,8 °C)	285,8 K (12,8 °C)	294,1 K (21,1 °C)
Temperaturerhöhung ΔT	9,4 K	9,0 K	5,0 K	13,6 K
Amylaseaktivität FIP-E/mg (Aktivitätsverlust)	22,2 (17,2 %)	23,7 (11,6 %)	22,7 (15,3 %)	23,2 (13,4 %)

Amylaseaktivität des Ausgangsmaterials: 26,8 FIP-E/mg

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, daß beim Exzenter die gemessene Temperatur in diesem Bereich praktisch keinen Einfluß auf die Enzymaktivität hat.

4.4. Verpressung auf einer gekühlten Rundlaufpresse**

Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeiten bestand die Möglichkeit auf einem gekühlten Rundläufer, der FETTE PERFECTA 2000 COOLTEX, die für eine Verpressung von Suppositorien-Fettmassen entwickelt worden war, Trockengranulat N zu tablettieren (83).

4.4.1. Maschineller Aufbau

Die Rundlaufpresse FETTE PERFECTA 2000 KLIMATEX war an ein FLÜSSIGKEITS- und LUFTKÜHLSYSTEM angeschlossen. Ersteres kühlt:

- Fülltrichter
- Fill-o-matic und
- Matrizenscheibe.

Als Kühlflüssigkeit wurde Glycerol/Wasser (7:3) verwendet. Mit dem System war eine Kühlung der Maschinenteile bis auf 277 K (+5 °C) möglich.

Da sich bei diesen Temperaturen Kondenswasser im Preßraum abscheiden würde, mußte der Maschine getrocknete Kaltluft (ca. 600 m³/h) zugeführt werden, die eine Temperatur von 280 K (7 °C) bei einer relativen Feuchte von 65 Prozent aufwies (Abbildung 40).

** Der Firma FETTE/SCHWARZENBEK danke ich für die Möglichkeit die Untersuchungen durchzuführen, sowie für die weitgehende Unterstützung bei den Preßversuchen. Für die Überlassung der für die Arbeiten notwendigen großen Mengen an Trockengranulat N danke ich der Firma MERCK/DARMSTADT.

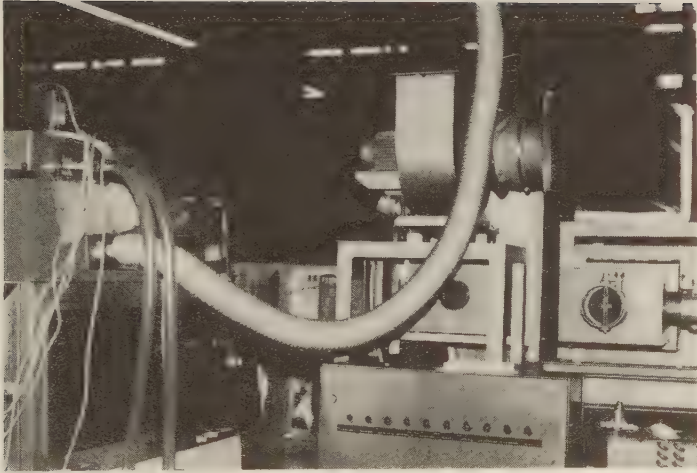


Abb. 40 Rückseite der Perfecta 2000 Klimatex mit Kaltluft- und Kühlflüssigkeitszufuhr.

Der gekühlte Schnellläufer war mit 5 Thermomeßfühlern instrumentiert, wodurch es möglich war, während der Verpressung die Temperaturen an folgenden Stellen der Maschine zu messen:

- Fülltrichter
- Fill-o-matic
- Matrizenscheibe
- Preßraum vorne
- Preßraum hinten (Abbildung 41 und 42).

Mittels eines Meßstellenumschalters erfolgte eine alternierende Digitalanzeige der gemessenen Werte. Die Temperatur der ablaufenden Tabletten wurde mit dem IR-Spektralpyrometer gemessen (Abbildung 42).

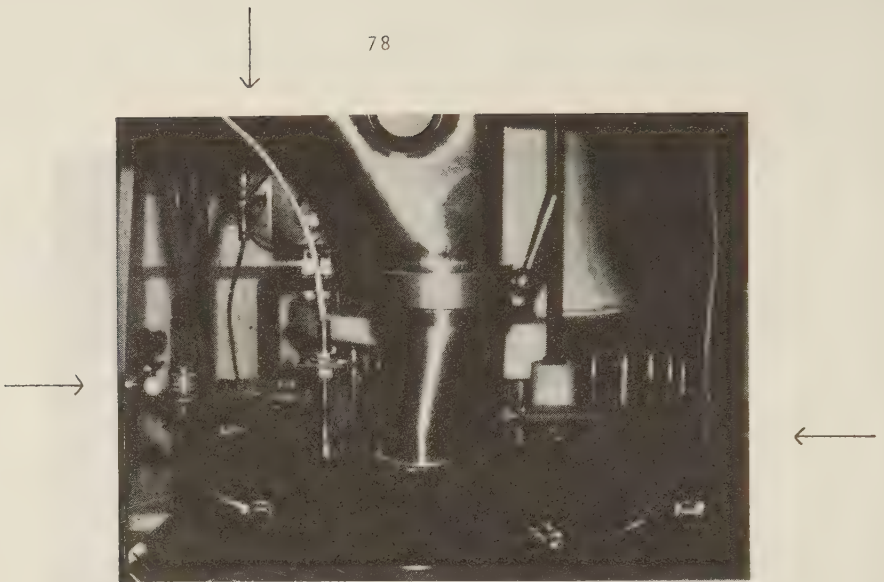


Abb. 41 Blick in den Pressraum. Im Vordergrund ist die gekühlte Fill-o-matic sichtbar. Man erkennt ausserdem die Temperaturmeßfühler für

- den Preßraum hinten
- die Fill-o-matic und
- den Matrizentisch.

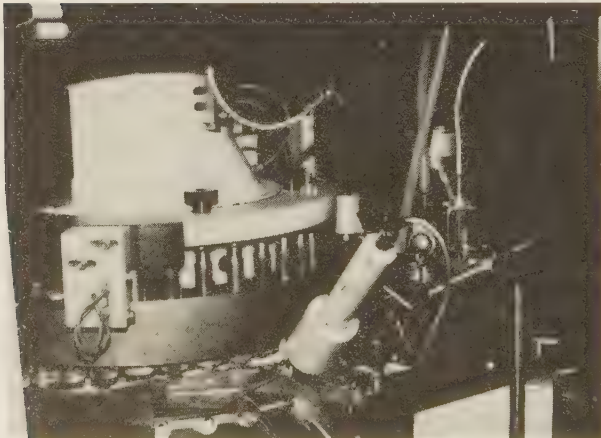


Abb. 42 Versuchsanordnung zur Messung der Temperatur ablaufender Tabletten.

Am Preßkraftüberwachungssystem konnten die Preßkräfte abgelesen werden; sie lagen zwischen 13 und 34 kN (133 und 347 MPa). Der Rundläufer war mit 36 Stempelsätzen (Oblong, 7,8x13,8 mm) ausgestattet.

Der maschinelle Versuchsaufbau sah folgendermaßen aus:

- 1 - Perfecta 2000 Climatex
- 2 - Kaltluftaggregat, Firma BERNER
- 3 - Flüssigkeitskühlsystem
- 4 - Meßstellenumschalter mit automatischer Digitalanzeige
- 5 - Ultrakust-IR-Spektralpyrometer, magnetstativfixiert im Preßraum mit angeschlossenen
- Servogor-Schreiber (Abbildung 43).

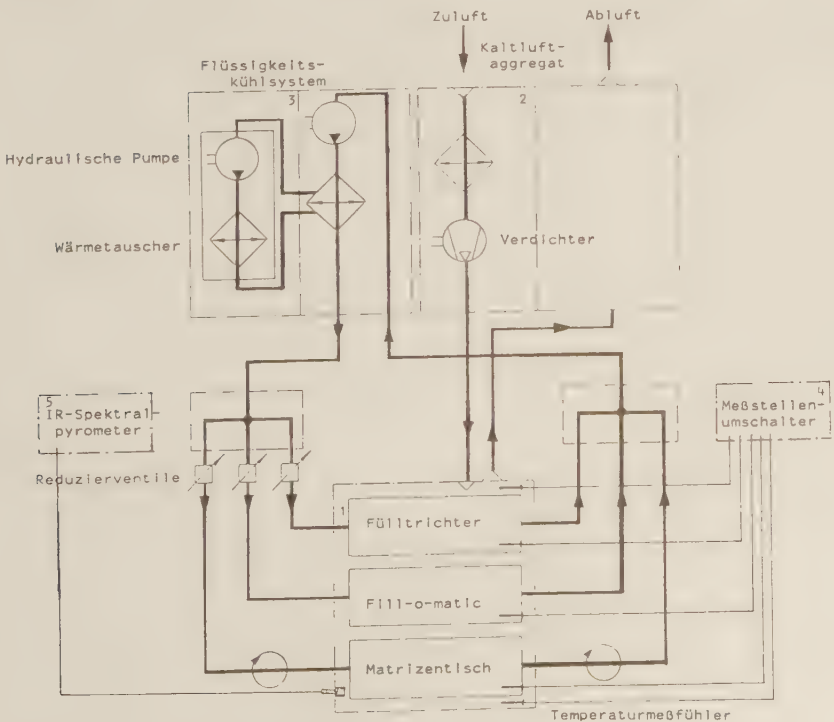


Abb. 43 Blockschaltplan des Versuchsaufbaus.

4.4.2. Versuchsanordnung

Mittels dieser Versuchsanordnung konnten folgende Parameter bezüglich ihrer Amylaseaktivität beeinflussenden Wirkung untersucht werden:

- Vorkühlung des Materials
- Gesamtkühlung der Maschine
- Teilkühlung der Maschine:
Kühlung des Fülltrichters, der Fill-o-matic
und der Luft
- Ungekühlte Maschine
- Änderung der Umdrehungsgeschwindigkeit
- Änderung der Preßkraft.

Tabelle 8 enthält die Versuchsbedingungen von Versuch 1 bis 7 sowie die Temperatur der ablaufenden Tabletten.

Tabelle 8 Verpressung von Pankreatin auf einer FETTE PERFECTA 2000
COOLTEX. Versuchsbedingungen und gemessene Temperaturen.

Versuchsnummer	Verwendetes Prägut	Material	Temperatur im Fülltrichter In K (°C)::	Maschine	Temperatur der Matrizescheibe In K (°C)	UpM	Preßkraft kN	Temperatur der ablaufenden Tabletten K (°C)
1a	Nutrilzym-Mischung :	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,2 (4,2 °C)	30	14 - 15,1	287 (14 °C)
1b	Nutrilzym-Mischung	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,2 (4,2 °C)	80	13,5 - 14,7	284 (11 °C)
2	Nutrilzym-Mischung	---	295 (22 °C)	Gesamtkühlung	278,2 (5,2 °C)	30	14 - 15,1	291,5 (18,5 °C)
3a	Nutrilzym-Mischung	---	295 (22 °C)	---	293,9 (20,9 °C)	30	13,5 - 16,3	304,1 (31,1 °C)
3b	Nutrilzym-Mischung	---	295 (22 °C)	---	294,9 (21,9 °C)	80	14	310,5 (37,5 °C)
4	Nutrilzym-Mischung	Vorkühlung	268 (-5 °C)	---	295,9 (22,9 °C)	30	14,6 - 15,6	300 (27 °C)
5a	Nutrilzym-Mischung	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Teilkühlung	283,5 (10,5 °C)	30	13,3 - 15,1	292,5 (19,5 °C)
5b	Nutrilzym-Mischung	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,8 (4,8 °C)	30	15,1	285,4 (12,4 °C)
5c	Nutrilzym-Mischung	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,9 (4,9 °C)	30	27,3 - 29,6	291,7 (18,7 °C)
6a	Nutrilzym-Mischung 95 T	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,8 (4,8 °C)	30	13,7 - 14,4	283,9 (10,9 °C)
6b	Nutrilzym-Mischung 95 T	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,7 (4,7 °C)	30	25,0 - 26,8	289,9 (16,9 °C)
6c	Elcema P 100	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,7 (4,7 °C)	30	29,6	290,9 (17,9 °C)
6d		Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,7 (4,7 °C)	30	34,1	292,2 (19,2 °C)
7a	Nutrilzym-Mischung 99,6 T	Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	278,1 (5,1 °C)	30	15,1	285,9 (12,9 °C)
7b	Aerosil 200	0,2 T Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,9 (4,9 °C)	30	18,2	287,4 (14,4 °C)
7c	Pfefferminzöl	0,2 T Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,9 (4,9 °C)	30	22,8 - 24,1	289,6 (16,6 °C)
7d		Vorkühlung	268 (-5 °C)	Gesamtkühlung	277,9 (4,9 °C)	30	30,9 - 31,9	291,5 (18,5 °C)

:: Trockengranulat N

::: Die Temperatur für das vorgekühlte Gut im Fülltrichter wurde geschätzt.

4.4.3. Ergebnisse

Temperaturentwicklung im Zuge des Kompressionsprozesses

Abbildung 44 zeigt die bei der Verpressung mit 30 UpM, einer Preßkraft von ca. 15 kN (154 MPa), aber verschiedenen Kühlbedingungen während eines Zeitraumes von 10 Minuten gemessenen Temperaturen.

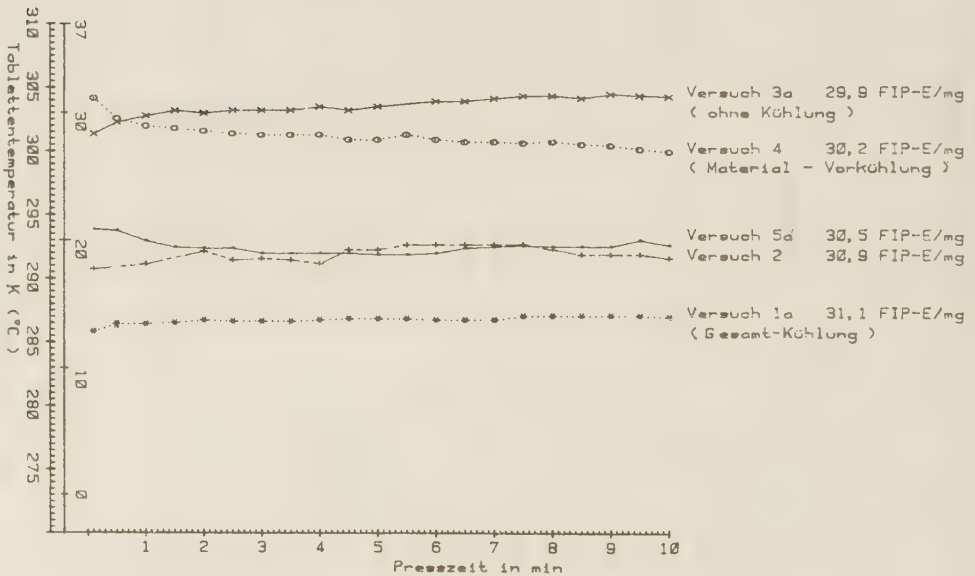


Abb. 44 Temperatur der ablaufenden Tabletten: Gemessen mit einem INFRAROT-SPEKTRALPYROMETER an einer FETTE PERFECTA 2000 COOLTEX.

Die bei einer Erhöhung der Umdrehungsgeschwindigkeit, bzw. der Preßkraft resultierenden Temperaturen, können Tabelle 8 entnommen werden.

Folgende Fakten wurden festgestellt:

- Die Temperatur der ablaufenden Tabletten stellt sich bereits unmittelbar nach Preßbeginn ein und bleibt danach praktisch konstant. Bei Versuch 4, bei dem nur das Preßmaterial vorgekühlt wurde, ist eine geringfügige Temperaturerniedrigung festzustellen, die als Folge einer Abkühlung des Matrizentisches anzusehen ist.
- Die Tablettentemperatur ist erwartungsgemäß am niedrigsten, wenn das Tablettiergut und die Maschine gekühlt sind; sie liegen zwischen 284 und 287 K (11 °C und 14 °C) (Versuch 1a, 1b, 5b, 6a, 7a).
- Bei ungekühlter Maschine und ungekühltem Material ergeben sich Temperaturen in Höhe von 304 K (31 °C) für 30 UpM (Versuch 3a) und von 310,5 K (37,5 °C) für 80 UpM (Versuch 3b).
- Bei Teilkühlung der Maschine werden ca. 292 K (19 °C) beobachtet (Versuch 5a); gleiches gilt für die Verpressung von ungekühltem Gut auf vollgekühlter Maschine (Versuch 2).
- Wird zwar das Preßmaterial, nicht dagegen die Maschine gekühlt, so treten relativ hohe Temperaturen von 300 K (27 °C) auf (Versuch 4).
- Die Versuche 5d bis 7d zeigen, daß bei Gesamtkühlung der Maschine und bei Vorkühlung des Materials in dem preßtechnisch Interessanten Bereich auch eine Linearität zwischen Preßkraft und Tablettentemperatur besteht (Abbildung 45).

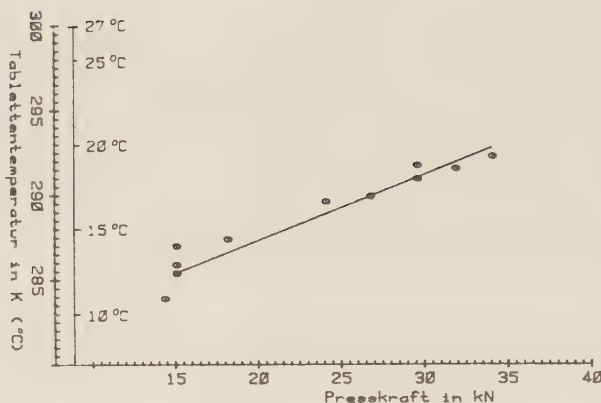


Abb. 45 Temperatur der ablaufenden Pankreatin-Tabletten in Abhängigkeit von der Preßkraft (Vollkühlung 30 UpM).

Tabletteneigenschaften

Variiert man bei der Verpressung außer der Temperatur von Granulat und Maschinenteilen auch die Preßkräfte, so müssen sich u.a. die folgenden Tabletteneigenschaften ändern:

1. Die Enzymaktivität* (6/7/8/51/84/85)
2. Die Tablettenfarbe* (50)
3. Die Bruchfestigkeit* (86/87)
4. Die scheinbare Dichte* (88/89).

Eine Veränderung der wahren Dichte, wie von HÜTTENRAUCH (90) für kristalline Substanzen beschrieben, war nicht zu erwarten und konnte auch nicht festgestellt werden.

* Bei der Auswertung blieben die Versuche 1b, 7a, 7b, 7c und 7d unberücksichtigt, da bei Versuch 1b die Preßkräfte zu stark variierten und die Tabletten der Versuche 7 Pfefferminzöl enthielten. Die Tablettenkennzahlen aller Versuche sind in Tabelle 17 und 18 Anhang aufgeführt.

Enzyminaktivierung

Unmittelbar nach Herstellung wurden die Amylaseaktivitäten der nach 4.4.2. hergestellten Tabletten bestimmt. Vergleicht man die erhaltenen Werte, so ergibt sich:

Bis zu einer Temperatur von 289 K (16 °C) tritt bei einer Preßkraft von 15 kN (154 MPa) eine konstante Amylaseaktivitätsabnahme in Höhe von ca. 4 % auf. In diesem Bereich kann kein thermischer Einfluß vorliegen. Im Temperaturbereich von 289 K (16 °C) bis 311 K (38 °C) nimmt die Amylaseaktivität linear mit der Temperaturerhöhung ab. Der Aktivitätsverlust beträgt bei gleicher Preßkraft und 311 K (38 °C) 9 %, bezogen auf das Ausgangsmaterial. Er setzt sich somit aus 4 % "mechanisch" bedingtem, temperaturunabhängigem und 5 % temperaturabhängigem Verlust zusammen (Abbildung 46).

Unter 293 K (20 °C) ist die Amylaseaktivität sehr stark von der Preßkraft abhängig. Bei Werten von ca. 30 kN (308 MPa) gemäß 5b bis 6d erhält man eine Inaktivierung von 11,8 % (Abbildung 47). Auffällig ist folgender Befund: Oberhalb von 27 kN (277 MPa) findet keine weitere Denaturierung mehr statt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Amylasedenaturierung unmittelbar nach der Herstellung sowohl von der Preßkraft als auch von der Temperatur abhängig ist. Höhere Preßkräfte wirken sich gegenüber höheren Temperaturen stärker enzyschädigend aus, wie aus den Versuchen 5 und 6 hervorgeht.

Änderungen der Tablettenfarbe

Es fiel auf, daß die Pankreatin-Kerne unterschiedlich stark verfärbt waren. Rein visuell konnte man feststellen, daß die bei hoher Temperatur hergestellten Tabletten wesentlich dunkler waren als die unter Kühlung hergestellten.

Wie die unter 3.2.3. beschriebenen Modellversuche bewiesen, ist die Braunfärbung in erster Linie von der Temperatur und weniger von der Preßkraft, die auf das Proteingemisch einwirkt, abhängig.

Abbildung 46 zeigt für frisch verpreßte Tabletten die Amylaseaktivität und die Verfärbung in Abhängigkeit von der Tablettemperatur. Daraus ergibt sich, daß die Amylaseaktivität der Tabletten um so geringer ist, je dunkler die Preßlinge sind (vergleiche 3.2.3.).

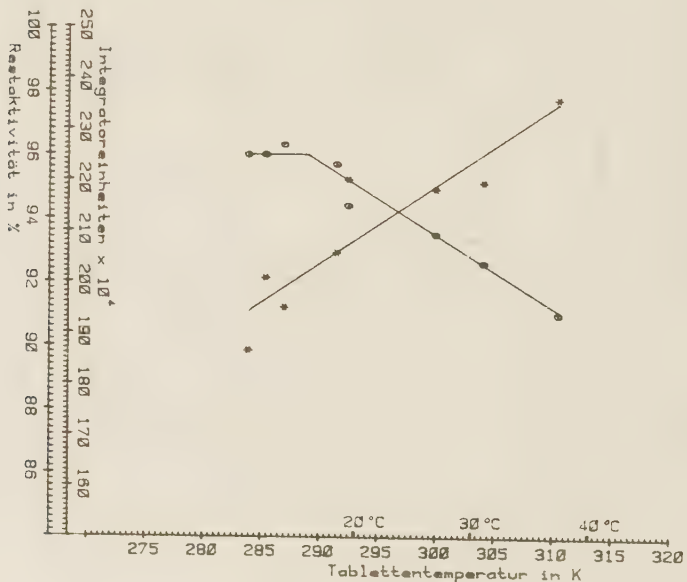


Abb. 46 Amylaseaktivität und Verfärbung in Abhängigkeit von der Tablettemperatur (IR-Spektralpyrometer) bei konstanter Preßkraft von ca. 15 kN (154 MPa) (Ausgangsaktivität: 32,3 FIP-E/mg).

Wird bei konstanter Maschinentemperatur die Preßkraft erhöht, so werden die Komprimata ebenfalls dunkler. Entsprechend nimmt die Amylaseaktivität ab (Abbildung 47); - in diesem Fall aber stärker als bei rein thermischer Inaktivierung. - Da hier die mit dem IR-Spektralpyrometer gemessenen Tablettentemperaturen nicht höher als 293 K (20 °C) waren, kann man die aufgetretene Verfärbung nur wie folgt erklären:

- Die Temperatur der Preßlinge war im Augenblick der Verpressung, also in der Matrice wesentlich höher (ca. 343 K/70 °C).
- Die Wirkung von Preßkraft und Preßtemperatur addieren sich (90), so daß bei niedriger Preßtemperatur aber höherer Preßkraft auch eine verstärkte Braunfärbung resultiert. Beide Erklärungen erscheinen plausibel.

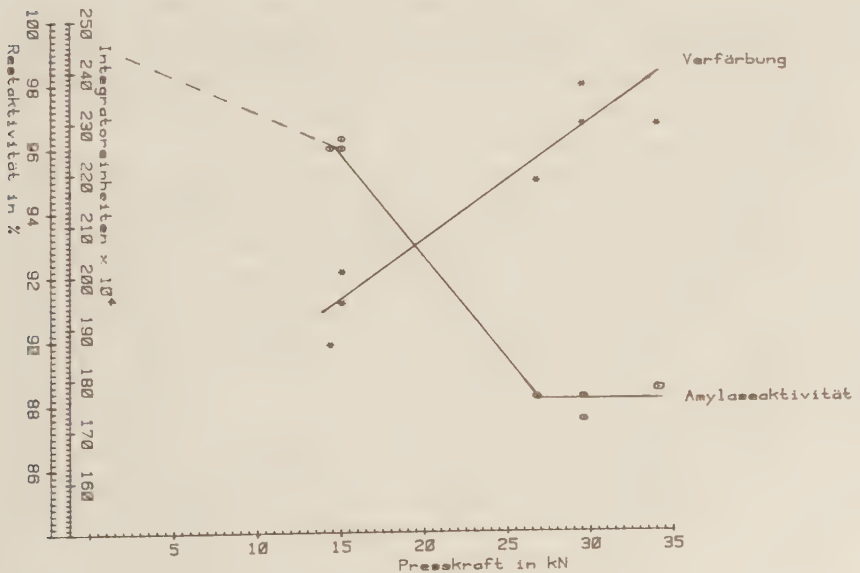


Abb. 47 Amylaseaktivität und Verfärbung in Abhängigkeit von der Preßkraft (Temperatur der ablaufenden Tabletten < 293 K (20 °C)/Ausgangsaktivität: 32,3 FIP-E/mg).

Bruchfestigkeit

Die mechanische Festigkeit der Oblong-Tabletten wurde mit einem ERWEKA TBH 28-Bruchfestigkeitstester mit angeschlossenem ERWEKA-Printer bestimmt. In Abbildung 50 und 51 sind die Werte in Abhängigkeit von Preßtemperatur und Preßkraft dargestellt. Sie liegen in einem Bereich von 100 bis 200 kN und sind somit als mechanisch widerstandsfähig zu bezeichnen.

Scheinbare Dichte und Rückdehnung

Bei der Herstellung der Tabletten wurde beobachtet, daß die Preßlinge, die zwar mit gleicher Preßkraft, aber unterschiedlicher Preßtemperatur hergestellt wurden, unterschiedliche Volumina und somit verschiedene SCHEINBARE DICHTEN aufwiesen. Bekanntlich ist die scheinbare Dichte von Tabletten von der Preßkraft abhängig (88/89/91/92), dagegen liegen keine exakten Befunde über die Beziehung zwischen der scheinbaren Dichte und der Preßtemperatur vor.

Das Volumen der Tabletten wurde aus den Größen Höhe h , Breite b , Länge l und der Steghöhe s berechnet. - Näheres hierzu siehe Anhang! - Abbildung 48 zeigt die SCHEINBARE DICHTEN und die BRUCHFESTIGKEIT in Abhängigkeit von der PRESSTEMPERATUR bei konstanter Preßkraft. Beide Werte nehmen linear mit der Preßtemperatur zu. - Korrelationskoeffizient für die Bruchfestigkeit bei linearer Regression: 0,7, d.h. Korrelation mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von ca. 5 %. - Wie Abbildung 49 zeigt, ist dies auch der Fall, wenn bei gleichbleibender Maschinentemperatur ($< 293 \text{ K}/20^\circ\text{C}$) die PRESSKRAFT erhöht wird.

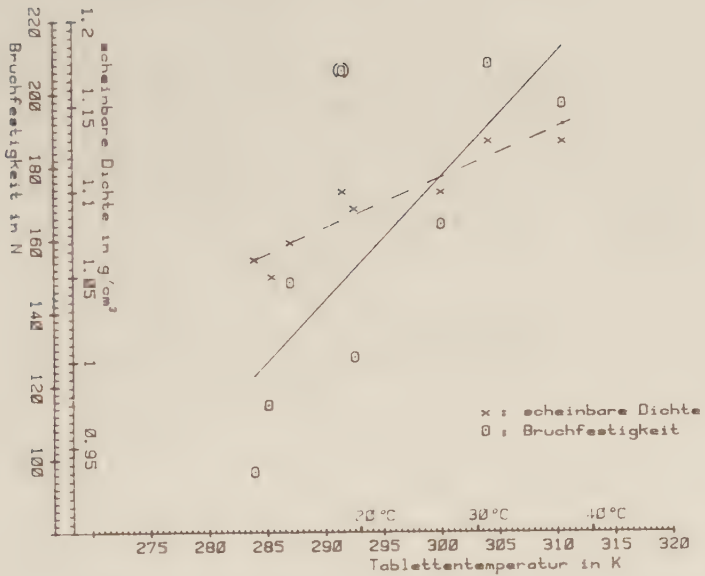


Abb. 48 Bruchfestigkeit und scheinbare Dichte in Abhängigkeit von der Tablettemperatur (IR-Spektralpyrometer) bei konstanter Preßkraft von ca. 15 kN.

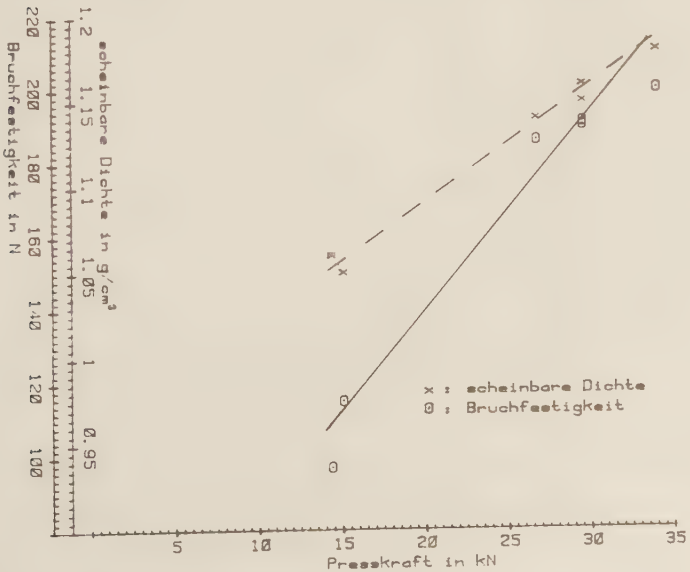


Abb. 49 Bruchfestigkeit und scheinbare Dichte in Abhängigkeit von der Preßkraft. Temperatur der ablaufenden Tabletten < 293 K (20 °C).

Bei der Interpretation dieser Befunde fällt die VERSTÄRKTE RÜCKDEHNUNG der UNTER KÜHLUNG und NIEDRIGER PRESSKRAFT hergestellten Tabletten auf. Anschaulich zeigen dies Abbildung 50 und 51. Sie geben die Rückdehnung der Tabletten nach dem Ausstoßen in Abhängigkeit von der Preßtemperatur und der Preßkraft wieder. Die Rückdehnung wird dabei angegeben als:

$$\text{Rückdehnung} = \left(1 - \frac{\text{scheinbare Dichte } (\rho_{\text{sch}}) \text{ nach Verpressung}}{\text{maximale Preßdichte } (\rho_{\text{max}}) \text{ bei max. Kompression}} \right) \cdot 100 (\%) \quad \text{Gl. 7}$$

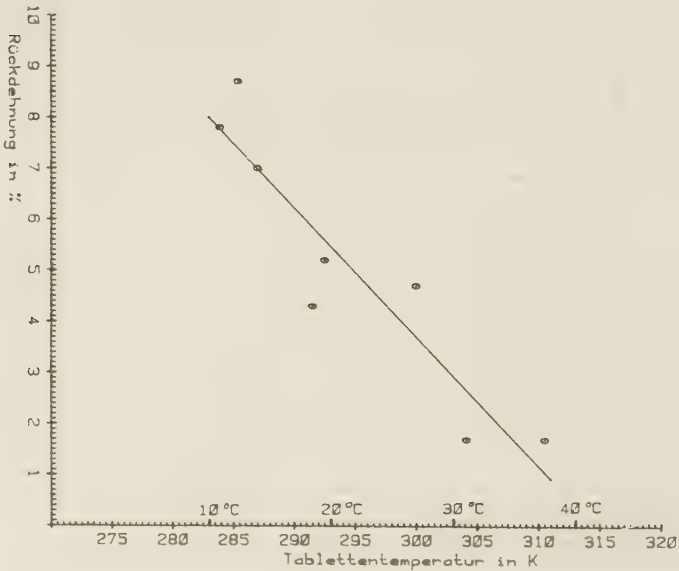


Abb. 50 Zusammenhang zwischen der Tablettentemperatur (bei konstanter Preßkraft von ca. 15 kN) und der Rückdehnung von Pankreatintabletten.

Zur Berechnung der scheinbaren Dichte im Augenblick der Verpressung wurden folgende Parameter herangezogen:

- Matrizenlänge
- Matrizenbreite
- Wölbungsradius
- Tablettenhöhe und
- Steghöhe der Tabletten (näheres siehe Anhang).

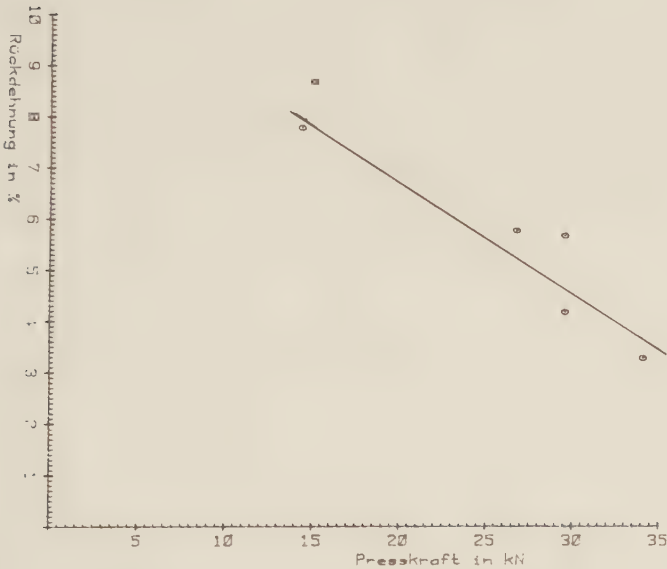


Abb. 51 Zusammenhang zwischen der Preßkraft und der Rückdehnung bei Pankreatintabletten. Temperatur der ablaufenden Tabletten $< 293 \text{ K}$ (20°C).

Die interpartikulären Wechselwirkungen der unter Kühlung und mit geringer Preßkraft hergestellten Tabletten sind im Vergleich zu den mit erhöhter Preßtemperatur und höherer Preßkraft hergestellten also geringer. - Auf die elastischen und plastischen Verformungseigenschaften wird später noch einzugehen sein.

Wahre Dichte, Porosität

Neben der scheinbaren Dichte (ρ_{sch}) wurde auch die WAHRE DICHTE (ρ) mit dem Fekrumeter bestimmt (29). Aus der scheinbaren und der wahren Dichte konnte nun die POROSITÄT (ϵ) der Tabletten berechnet werden:

$$\epsilon = \left(1 - \frac{\text{scheinbare Dichte } (\rho_{sch})}{\text{wahre Dichte } (\rho)} \right) 100 \% \quad \text{Gl. 8} \quad (28)$$

Die Werte zeigt Tabelle 18 Anhang. Wie nicht anders zu erwarten, nimmt die Porosität mit steigender Preßkraft ab (87). Durch den Einsatz der gekühlten Rundlaufmaschine konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, daß bei konstanter Preßkraft (15 kN) die alleinige Temperaturerhöhung zu kompakteren Tabletten mit einer um ca. 5 Prozent verringerten Porosität bei $\Delta T = 25 \text{ K}$ führte.

4.4.4. Zusammenfassung

Die unmittelbar nach Herstellung gewonnenen Untersuchungsergebnisse zeigen, daß die Amylaseinaktivierung zum einen mechanischer, zum anderen aber auch thermischer Natur ist. Variiert man bei gleichbleibender Preßkraft die Preßtemperatur, so tritt unter $289 \text{ K}/16^\circ\text{C}$ eine Amylasedenaturierung von ca. 4 % auf. Im Temperaturbereich zwischen 289 K (16°C) und 313 K (38°C) wird ein deutlicher Temperatureinfluß sichtbar: Die Amylaseaktivität nimmt hier linear um weitere 5 % ab. Diese Resultate stimmen mit den Verfärbungsmessungen überein.

Nicht so eindeutig sind die Verhältnisse bei gleichbleibender Maschinentemperatur aber unterschiedlicher Preßkraft: Eine bei ca. 30 kN (308 MPa) unter Vollkühlung auftretende Enzymdenaturierung von ca. 12 % scheint mechanischer Natur, d.h. unabhängig von der Integraltemperatur* zu sein, aber aufgrund der Verfärbung der Tabletten kann eine thermische Inaktivierung nicht ausgeschlossen werden.

Bruchfestigkeit und scheinbare Dichte sind von Preßkraft und Preßtemperatur abhängig. Daß hohe Preßkräfte zu mechanisch widerstandsfähigeren Tabletten führen ist nicht überraschend; interessant ist aber die nachgewiesene starke Abhängigkeit von der Temperatur. Auf dieses Phänomen wird nachstehend näher eingegangen.

4.4.5. Tablettenkennzahlen in Abhängigkeit von Preßtemperatur und Preßkraft

Um festzustellen, inwieweit sich die Eigenschaften der Preßlinge bei anschließender Temperatureinwirkung, d.h. ohne Krafteinwirkung ändern, wurden Tabletten - und zwar diejenigen, die bei der Verpressung die geringste Temperaturbelastung erfahren hatten (Versuch 5b), erwärmt und danach überprüft, inwieweit sich die Tabletteneigenschaften verändert hatten.

* Unter der Integraltemperatur einer Tablette versteht man die nach Verpressung mit herkömmlichen Temperaturmeßgeräten (z.B. IR-Spektralpyrometer) erfaßbare "Tablettenoberflächentemperatur" (61).

Versuchsanordnung

Im Hinblick auf eine gleichmäßige und kontrollierte Erwärmung der Tabletten wurde die unter 3.2.1. beschriebene Apparatur benutzt. Die Komprimattemperaturen sollten 1 bis 2 mm unter der Oberfläche gemessen werden, um gut reproduzierbare Werte zu erhalten. Dazu wurden sie auf ein Thermoelement aufgesteckt, so daß alle Temperaturen zwischen 273 K (0 °C) und 373 K (100 °C) DIREKT IM TABLETTENKÖRPER gemessen werden konnten. Die Dauer der Temperatureinwirkung betrug in allen Fällen 8 Minuten; die Abkühlungsphase war nach 2 Minuten beendet.

Ergebnisse

Nach dem Erwärmen wurden AMYLASEAKTIVITÄT, VERFÄRBUNG, BRUCHFESTIGKEIT und SCHEINBARE DICHTEN bestimmt. Abbildung 52 und 53 geben die Verhältnisse wieder.

Die Tabletteneigenschaften verändern sich erst oberhalb einer Temperatur von 333 K (60 °C). Wenn man berücksichtigt, daß die Koagulationstemperatur für Eiweiß bei ca. 343 K (70 °C) liegt, überrascht der erhaltene Befund nicht.

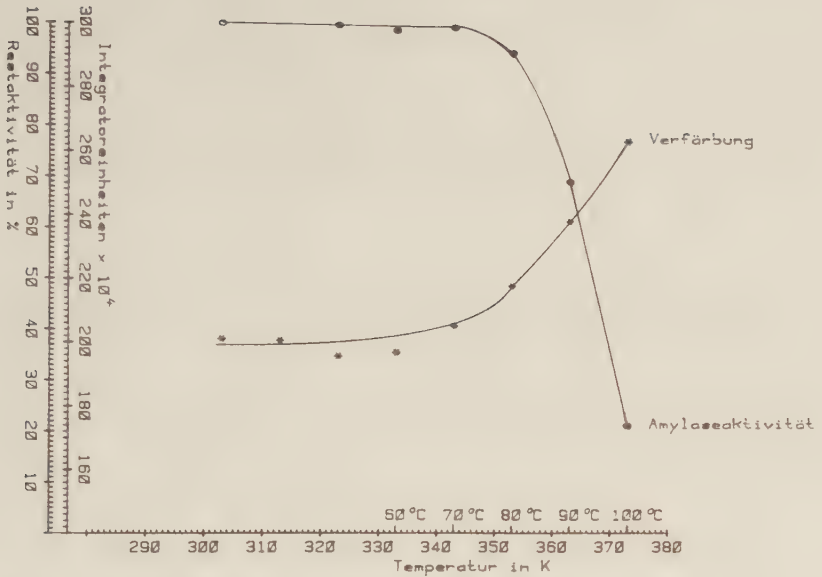


Abb. 52 Veränderung der Verfärbung (Integratoreinheiten) und der α -Amylaseaktivität (FIP-E/mg) bei Temperaturbelastung (8 Minuten). (Ausgangsaktivität: 30,2 FIP-E/mg).

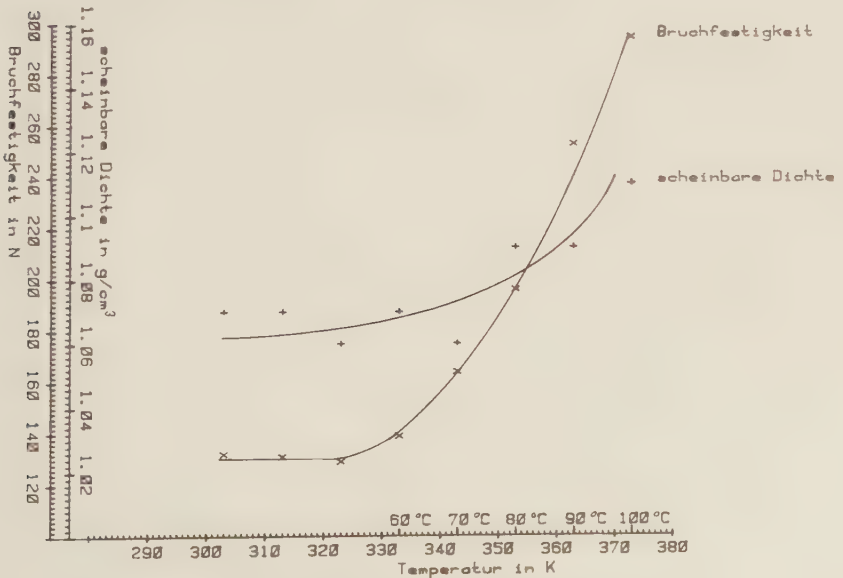


Abb. 53 Veränderung der scheinbaren Dichte (g/cm^3) und der Bruchfestigkeit (N) bei Temperaturbelastung (8 Minuten).

Diskussion

Aus den Abbildungen 52 und 53 kann man noch weitere Informationen ableiten:

Bei den Chargen 1a, 2, 3a, 3b, 4, 5a, 5b und 6a wurde die Preßtemperatur bei konstanter Preßkraft variiert. Änderungen der Tabletteneigenschaften können bei diesen Versuchen also nur auf die Preßtemperatur zurückgeführt werden.

Vergleicht man die Tabletteneigenschaften bei steigender Preßtemperatur und konstanter Preßkraft mit den Veränderungen bei rein thermischer Belastung, so gibt es für dieses Verhalten nur die zwei schon erwähnten Erklärungsmöglichkeiten:

- Die PRESSTEMPERATUR muß unmittelbar bei der Verpressung WESENTLICH HÖHER sein, als die mit dem IR-Spektralpyrometer gemessenen Temperaturen. Es müßten Preßtemperaturen von 343 bis 363 K (70 bis 90 °C) auftreten.
- Bei gleichzeitig einwirkender PRESSKRAFT und PRESSTEMPERATUR ergibt sich ein ADDITIVES ZUSAMMENWIRKEN beider Größen, d.h. temperaturbedingte Effekte treten bei gleichzeitig einwirkender Preßkraft bei wesentlich niedrigeren Temperaturen auf.

Um diese entscheidende Frage näher zu klären, muß darauf eingegangen werden, welche der beiden Einflußgrößen während der Tablettierung zu den resultierenden Tabletteneigenschaften führt.

4.4.6. Mechanische und thermische Vorgänge bei der Tablettenbildung

Theorie

Bei der Tablettenbildung entsteht unter Verformung des Ausgangsmaterials eine "Matrix", die der Tablette ihre Festigkeit verleiht.

Als Verformungsarten werden im allgemeinen diskutiert:

- elastische Verformung
- Bruchvorgänge
- plastische Verformung.

Je nach Zusammenhalt der Preßlinge unterscheidet man:

- formschlüssige Preßlinge
- Kohäsions- oder Adhäsionspreßlinge und
- Sinterpreßlinge (70/93).

FORMSCHLÜSSIGE, KOHÄSIONS- bzw. ADHÄSIONSPRESSLINGE entstehen im wesentlichen durch MECHANISCHE, SINTERPRESSLINGE durch THERMISCHE Veränderungen des Tablettierguts während der Verpressung. Verformung und Tablettenbildung sind für kristalline Stoffe wie LACTOSE und EPHEDRINHYDROCHLORID gut beschrieben: Es kommt im wesentlichen zu einer PLASTISCHEN VERFORMUNG.

Nach HÜTTENRAUCH (90) führt diese bei der Verpressung zu einer MECHANISCHEN AKTIVIERUNG, worunter er das Ausmaß der Gitterstörungen im Tablettiergut versteht. - Je mehr Gitterstörungen auftreten, desto höher ist die Aktivierung. "Erst durch diese Aktivierung entsteht eine Auflockerung, die dem Ineinanderfritten der Gitter Raum gibt, die den Gitterbausteinen Bewegungsmöglichkeiten verleiht, und die aufgrund ihrer erhöhten Energie eine Triebkraft für die Reorganisation der Gitterordnung darstellt." Dieser Vorgang wird von anderen Autoren auch als "KÄLTES FLIESSEN" bezeichnet.

Nach FÜHRER (70) kommt es bei der plastischen Verformung im Zuge der Tablettierung kristalliner bzw. teilkristalliner Substanzen zu einer GLEITVERFORMUNG bzw. ZWILLINGSBILDUNG. Darunter versteht man das Gleiten bzw. das Umlappen von Kristallen an Stellen maximaler Gitterstörungen.

Bei derartigen Vorgängen entstehen formschlüssige Preßlinge, oder falls es zu Wechselwirkungen zwischen den neu gebildeten Oberflächen kommt, Kohäsions- bzw. Adhäsionspreßlinge (z.B. Stärketabletten (94)).

Nach HÜTTENRAUCH und FÜHRER ist die Komprimatbildung also auf mechanische Einflüsse zurückzuführen.

Demgegenüber stehen Untersuchungen anderer Autoren (61/95), welche THERMISCHE EFFEKTE für die Tablettenbildung verantwortlich machen:

Wirkt auf ein Pulverbett eine mechanische Kraft ein, so kommt es neben einer plastischen Verformung auch zu Bruchvorgängen. An den Bruchflächen treten im Moment des Entstehens kurzfristig (10^{-3} bis 10^{-4} s) in sehr eng begrenzten Bezirken (10^{-3} cm²) außergewöhnlich hohe Temperaturen (mehrere 10^3 K) auf (61/66/77). Wird in diesen "HOT SPOTS" nun die Schmelztemperatur des Tablettierguts erreicht, kommt es zur Ausbildung von Sinterbrücken (95/61). Die Eigenschaften eines Preßlings wären nach diesen Überlegungen also nicht von der Integraltemperatur der Tablette, sondern von der Maximaltemperatur weniger "hot spots" abhängig.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Tablettenbildung bei AMORPHEN STOFFEN - wie dem Pankreatin - ist auch hier eine plastische Verformung des Materials. Dabei finden ebenfalls echte Fließvorgänge statt, wobei sich die einzelnen Bauelemente des Materials entsprechend den angreifenden Kraftvektoren irreversibel gegeneinander verschieben. Bei Makromolekülen kann es so zu einer Orientierungsänderung einzelner Molekülsegmente im Raum kommen (80). Im allgemeinen stellt man sich den Gefügebau bei amorphen Stoffen über formschlüssige Bindungen bzw.

Kohäsions- oder Adhäsionskräfte vor. Aber auch das Auftreten von Sinterbrücken ist denkbar.

Eigene Beobachtungen

Bei der Ausbildung eines Pankreatinkomprimats kommen sowohl mechanische wie auch thermische Einflüsse zur Geltung. Im einzelnen laufen folgende Prozesse ab:

- Verpreßt man ein Trockengranulat N unter Kühlung (Versuch 1a, 1b, 5b, 6a, 7a) mit einer Preßkraft von ca. 15 kN (154 MPa), kommt es zu einer mechanischen Deformation, wie die REM-Aufnahmen Abbildung 54 und 57 beweisen. Die dabei gemessene Integraltemperatur von ca. 285 K (12 °C) reicht nicht aus, um bei dieser an sich üblichen Preßkraft ein Sintern des Pankreatins hervorzurufen. Die durch interpartikuläre Wechselwirkungen entstandene Wärme wird sofort über die Matrize an die Maschine abgegeben. - Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß eine thermisch bedingte Verfärbung ausblieb. - Als Folge davon ist der Anteil an elastischer Verformung relativ groß, was sich auch in der niedrigen scheinbaren Dichte, der geringen Bruchfestigkeit und der geringen Enzymschädigung äußert.
- Verpreßt man Trockengranulat N dagegen bei Raumtemperatur mit gleicher Preßkraft, so kommt es zwar zunächst zu der gleichen mechanischen Deformation; die jetzt erreichte höhere Temperatur führt aber zu Sintervorgängen (siehe Abbildung 55 und 58). Dadurch resultiert eine stärkere Verfärbung, eine erhöhte scheinbare Dichte, eine hohe Bruchfestigkeit und eine stärkere Enzymdenaturierung.

Um diese Tabletteneigenschaften zu erhalten, müssen sich MECHANISCHE und THERMISCHE PROZESSE in Ihrer Wirkung ADDIEREN. Hierfür spricht im einzelnen:

- Das Auftreten von "hot spots" kann für die Tablettenbildung nur von untergeordneter Bedeutung sein, da die Tabletteneigenschaften in dem engen Temperaturbereich von 285 - 310 K (12 - 37 °C) nicht so stark differieren dürften. Unabhängig von der gemessenen Tablettentemperatur müßte bei gleicher Preßkraft nämlich immer annähernd die gleiche Anzahl und Intensität von "hot spots" auftreten.
- Bei der Verpressung von Pankreatin-Granulat mit erhöhter Preßkraft, aber unter Kühlung, resultieren ähnliche Eigenschaften wie bei niedriger Preßkraft ohne Kühlung.
- Tempert man Preßlinge der Charge 5b (Vollkühlung), so treten die gleichen Tabletteneigenschaften, die man bei Zimmertemperatur-Verpressung erhält, erst bei ca. 363 K (90 °C) auf (siehe Abbildung 52 und 53).

4.4.7. REM-Untersuchungen

Die Vorstellungen über den Kompressionsprozeß von Trockengranulat N konnten mittels Gefügeuntersuchungen durch REM-Aufnahmen bestätigt werden. Abbildung 54, 55 und 56 zeigen die Tablettenoberfläche, Abbildung 57, 58 und 59 die Bruchkanten von Komprimaten der Chargen 5b, 3b und 5c.

Man erkennt deutlich, daß es sowohl an der Oberfläche als auch im Inneren der Tabletten zu einer plastischen Verformung kommt.

Sie ist am geringsten, wenn mit 15 kN (154 MPa) bei VOLLKÜHLUNG verpreßt wird (Abbildung 54 und 57). Die Bruchstelle erscheint deutlich strukturiert, das Gefüge ist locker (starke elastische Rückdehnung). Sintervorgänge und "kaltes Fließen" sind im Vergleich zu den anderen Abbildungen im Inneren der Tablette weniger deutlich ausgeprägt. Die Festigkeit der "Matrix" dürfte durch formschlüssige Bindungen bzw. durch Kohäsions- und Adhäsionskräfte bedingt sein.

Verpreßt man hingegen bei ZIMMERTEMPERATUR mit gleicher Preßkraft von 15 kN (154 MPa), so erkennt man, daß es an der Oberfläche und im Inneren der Tablette zu großflächigen Zusammenlagerungen gekommen ist. Diese können nur durch höhere Temperaturen entstanden sein (Abbildung 55 und 58).



Abbildung 54

Oberfläche : Versuch 5b
(Vollkühlung)
Preßkraft : ca. 15 kN (154 MPa)
Preßtemperatur: ca. 285 K (12 °C)



Abbildung 55

Oberfläche : Versuch 3b
(ungekühlt)
Preßkraft : ca. 15 kN (154 MPa)
Preßtemperatur: ca. 310 K (37 °C)

10 μm



Abbildung 56

Oberfläche : Versuch 5c
(Vollkühlung)
Preßkraft : ca. 30 kN (308 MPa)
Preßtemperatur: ca. 292 K (19 °C)

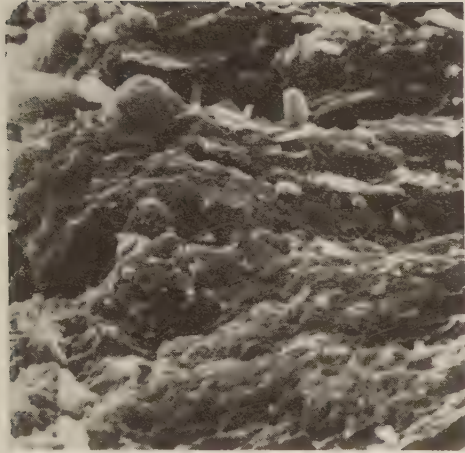


Abbildung 57

Bruchkante : Versuch 5b
(Vollkühlung)
Preßkraft : 15 kN (154 MPa)
Preßtemperatur: ca. 285 K (12 °C)



Abbildung 58

Bruchkante : Versuch 3b
(ungekühlt)
Preßkraft : 15 kN (154 MPa)
Preßtemperatur: ca. 310 K (37 °C)

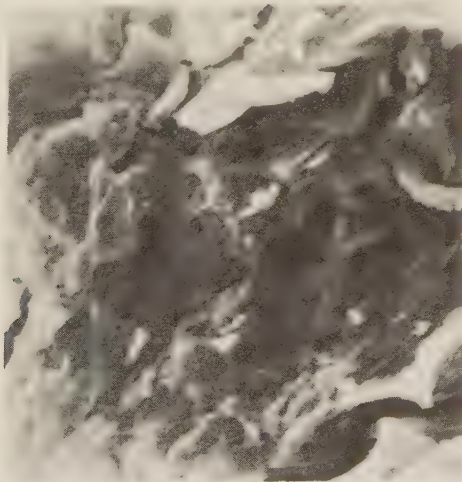


Abbildung 59

Bruchkante : Versuch 5c
(Vollkühlung)
Preßkraft : ca. 30 kN (308 MPa)
Preßtemperatur: ca. 292 K (19 °C)

10 μm

Bei der Verpressung unter VOLLKÜHLUNG, aber mit erhöhter Preßkraft von ca. 30 kN (308 MPa) (Abbildung 56, 59) treten kompakte Strukturen auf. Das Tablettiergut ist - ohne, daß höhere Temperaturen auftreten - zu einem Formkörper "verschmolzen". Das Fließen erfolgte weitgehend durch mechanischen Einfluß und kann als "kaltes Fließen" angesehen werden.

Zusammenfassung

Bei der Tablettierung verhält sich Pankreatin isotrop, d.h. die Verformungseigenschaften sind richtungsunabhängig (siehe Abbildung 60). Im wesentlichen kommt es zu einer plastischen Verformung; Bruchvorgänge dürften keine Rolle spielen. Für den Gefügebau sind mechanische und thermische Einflüsse verantwortlich.

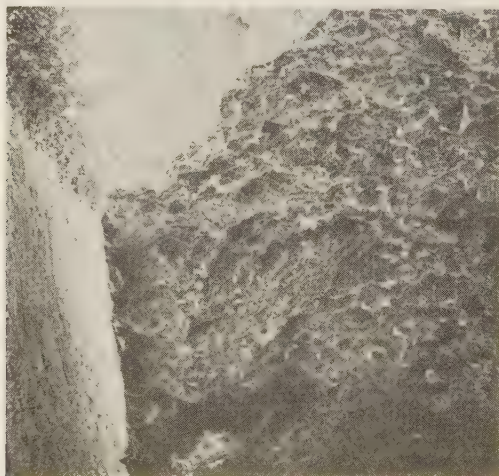


Abb. 60 Pankreatinpreßling, Bruchstelle mit Steg und Oberseite.

Verpreßt man Trockengranulat N unter Kühlung, so resultieren Preßlinge, die durch formschlüssige Bindungen und Kohäsions- bzw. Adhäsionskräfte zusammengehalten werden. Die elastische Rückdehnung ist verhältnismäßig groß, so daß Preßlinge mit geringerer scheinbarer Dichte, geringer Bruchfestigkeit und hoher Enzymaktivität resultieren.

Findet die Trockengranulat N-Kompression dagegen unter Normalbedingungen statt, wird die Verformung durch Sinterbrücken manifest. Hier ist die elastische Rückdehnung gering; eine erhöhte scheinbare Dichte, eine hohe Bruchfestigkeit und eine größere Enzyminaktivierung sind die Folge.

Wenn man bei Vollkühlung mit hoher Preßkraft tablettiert, resultieren ähnliche Eigenschaften, die in diesem Fall allerdings die Folge eines mechanisch induzierten Fließens sein dürften. Die Eigenschaften eines Pankreatinpreßlings müssen also auf eine Addition von Preßkraft und Preßtemperatur zurückgeführt werden.

Abbildung 61 zeigt schematisch die im Preßvorgang von Pankreatin liegenden Ursachen für die Änderungen von Tabletteneigenschaften.

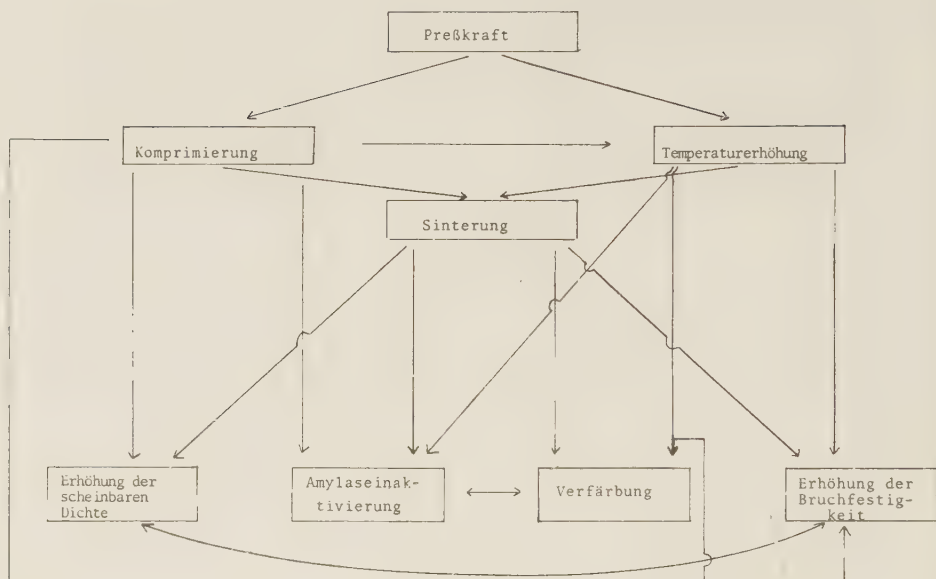


Abb. 61 Schematische Darstellung der im Preßvorgang zu suchenden Ursachen für die untersuchten Änderungen von Tabletteneigenschaften.

Nach diesen Versuchen konnte man den Schluß ziehen, daß eine Verpressung unter Vollkühlung und Anwendung relativ geringer Preßkräfte eine Lösung der galenischen Probleme bringen würde. Diese Annahme ist allerdings nicht in vollem Umfang zutreffend, weil einerseits der technische Aufwand relativ groß ist und andererseits die Stabilität derartiger Komprimatate nicht erwiesen war.

4.5. Stabilitätsuntersuchungen

4.5.1. Untersuchungsergebnisse

Zur Prüfung der Frage, inwieweit sich eine Änderung der Preßtemperatur und der Preßkraft auf die Lagerstabilität der α -Amylase auswirken würde, wurden die Pankreatinkerne unter Normalbedingungen (Zimmertemperatur 295 ± 1 K; 50 - 60 % relative Feuchte) gelagert. Ein halbes Jahr und ein Jahr nach Herstellung wurden die Amylaseaktivitäten bestimmt. Das Ergebnis* überraschte:

Mit GLEICHER PRESSKRAFT, aber UNTERSCHIEDLICHER TEMPERATUR hergestellte Tabletten gleichen sich nach einem halben Jahr hinsichtlich ihrer Enzymaktivität weitgehend an und diese bleibt danach konstant (siehe Abbildung 62 und 64).

In einem Diskussionsbeitrag zu einem Vortrag anlässlich eines Symposiums bei derACHEMA 1982 wurde diese Beobachtung bestätigt.

* Die Untersuchungsdaten sind im einzelnen in Tabelle 17 Anhang aufgeführt.

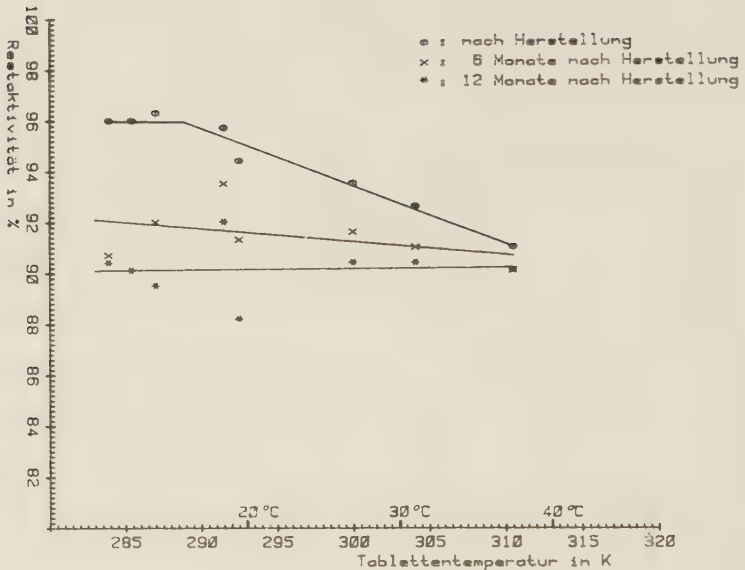


Abb. 62 α -Amylaseaktivität nach Herstellung, 0,5 Jahre und 1 Jahr nach Herstellung in Abhängigkeit von der Temperatur der ablaufenden Tabletten (Preßkraft: 13,3 - 15,6 kN - Ausgangsaktivität: 32,3 FIP-E/mg). Fette Perfecta 2000 Cooltex.

Verpreßte man hingegen unter VOLLKÜHLUNG, aber mit STEIGENDER PRESSKRAFT, so tritt diese Erscheinung nicht auf. Die Amylaseaktivitäten gleichen sich nicht an. Es besteht auch nach einem Jahr noch ein deutlicher Unterschied zwischen der Amylaseaktivität einer mit geringer Preßkraft und einer mit hoher Preßkraft hergestellten Tablette (Abbildung 63).

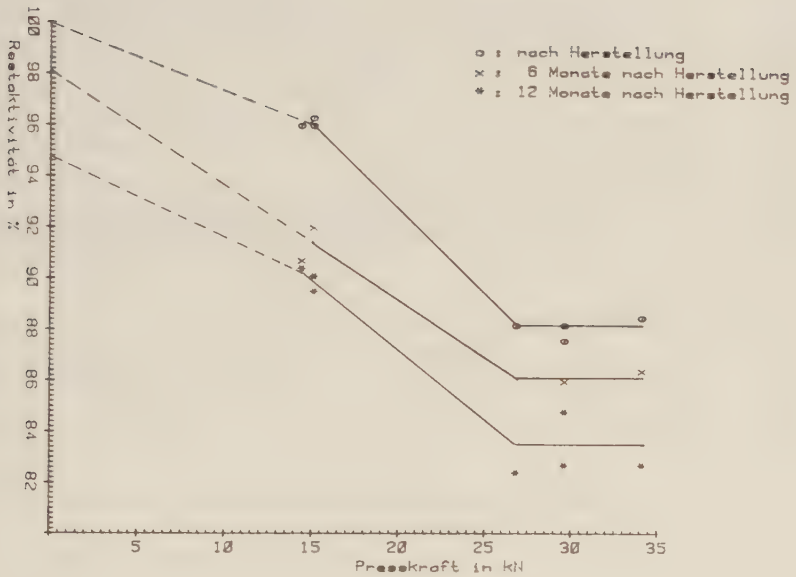


Abb. 63 α -Amylaseaktivität nach Herstellung, 0,5 Jahre und 1 Jahr nach Herstellung in Abhängigkeit von der Preßkraft (Temperatur der ablaufenden Tabletten: $<293\text{ K}$ - Ausgangsaktivität $32,3\text{ FIP-E/mg}$). Fette Perfecta 2000 Cooltex.

Die Bedeutung der bei der Kompression angewendeten Kraft und der Preßtemperatur für die sekundäre Aktivitätsabnahme geht aus Abbildung 64 hervor, bei der während eines Zeitraums von 12 Monaten für Trockengranulat N, Versuch 5b, 3b, 4 und 5c die jeweils gefundenen Aktivitäten aufgetragen wurden.

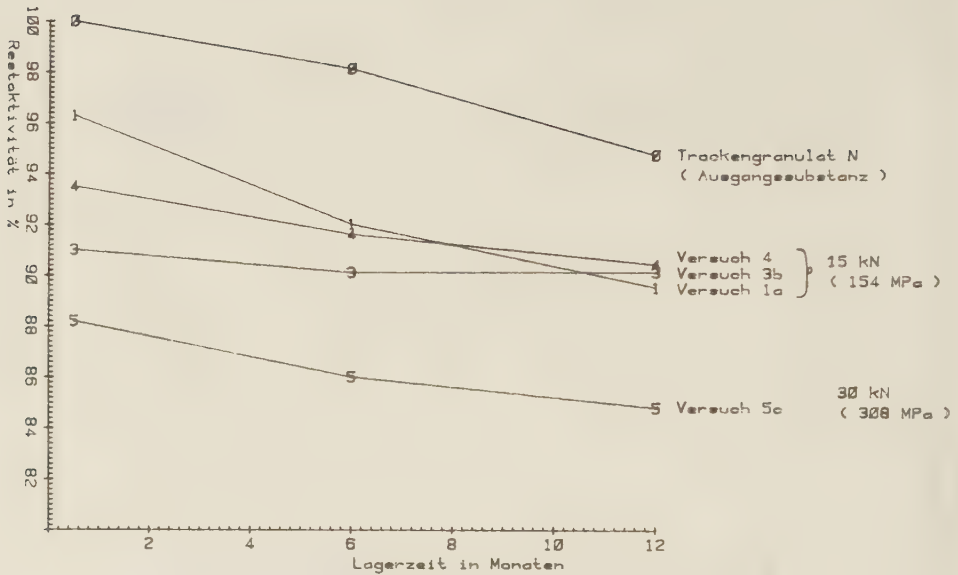


Abb. 64 α -Amylaseaktivitätsrückgänge von Pankreatin-tabletten bei Lagerung (Ausgangsaktivität 32,3 FIP-E/mg).

Aus den Untersuchungsbefunden lassen sich folgende Aussagen ableiten:

- 1) Alle untersuchten Präparate weisen nach der Tablettierung signifikante Aktivitätsrückgänge auf.
- 2) Tabletten, die unter Kühlung hergestellt wurden, verlieren also bei Lagerung an Aktivität, bei Zimmertemperatur verpreßte Tabletten erleiden zwar eine starke Primärinaktivierung, erweisen sich aber bei anschließender Lagerung als stabil, d.h. es findet keine sekundäre Inaktivierung statt.
- 3) Hohe Preßkräfte von 30 kN sind trotz Vollkühlung für eine

noch stärkere Primärveränderung verantwortlich. Hier liegen die Primärverluste bei ca. 12 %; eine starke Gefügeverdichtung läuft parallel. Obwohl diese Komprimata eine starke Schädigung durch die Verpressung erfahren haben, sind sie im Gegensatz zu den unter 3b beschriebenen Mustern nicht lagerstabil. Sie zeigen etwa die gleiche Abnahmegewindigkeit wie die Ausgangssubstanz und weisen nach 12 Monaten ca. 16 % Verlust auf.

- 4) Aufgrund der Tatsache, daß bei mit NIEDRIGER PRESSKRAFT ohne ZUSÄTZLICHE KÜHLUNG gewonnene Tabletten praktisch keine sekundären Verluste auftraten, ist für die Praxis eine Verpressung unter Kühlung nicht zwingend erforderlich. Wichtig ist indessen das PRESSKRAFTLIMIT nicht zu überschreiten.

Die Annahme, daß die Angleichung der Aktivitäten der mit gleicher Preßkraft aber unterschiedlicher Preßtemperatur hergestellten Tabletten von deren unterschiedlichem Wassergehalt abhängt, bestätigten sich nicht. Die Zufuhr trockener Kaltluft bei der Verpressung verhinderte Kondensationsvorgänge. Der Wassergehalt von Trockengranulat N und aller untersuchten Proben lag bei ca. 4 %. Auch die höheren Porositäten der bei 15 kN unter Kühlung hergestellten Tabletten konnten das beschriebene Phänomen nicht erklären.

Die unterschiedliche Stabilität bei Lagerung und insbesondere die beschriebene Amylaseaktivitätsangleichung muß also ihre Ursache im Preßvorgang selber haben.

4.5.2. Maximale Preßdichte

Da die Preßkraft für einzelne Tabletten auf Rotationsschnellläufern nicht erfaßt werden kann, mußte - um zu zeigen, daß die Amylaseaktivität von der Preßkraft abhängt - eine Größe eingeführt werden, die für jede einzelne Tablette zugänglich und der Preßkraft annähernd proportional ist.

Eine derartige Größe ist das Volumen, welches die Tablette während des Preßvorgangs einnimmt (96/97). Es ist aus den Abmessungen des Preßlings und den Matrizen- bzw. Stempelmaßen zugänglich. Um die einzelnen Tabletten miteinander vergleichen zu können, wurde als Größe die MAXIMALE PRESSDICHTE ($\rho_{\max}$) gewählt.

Sie ist definiert als:

$$\text{maximale Preßdichte } (\rho_{\max}) = \frac{\text{Masse der Tablette } g}{\text{geringstes Volumen bei der Verpressung } \text{cm}^3} \quad \text{Gl. 9}$$

Abbildung 65 zeigt den Zusammenhang zwischen $\rho_{\max}$ und der Preßkraft.

Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte der unter Vollkühlung hergestellten Tabletten. Es besteht, wie nicht anders zu erwarten war, ein direkter Zusammenhang zwischen $\rho_{\max}$ und der angewandten Preßkraft.

*: Berechnet wird das Volumen im Augenblick der maximalen Verdichtung in der Matrice (siehe Anhang).

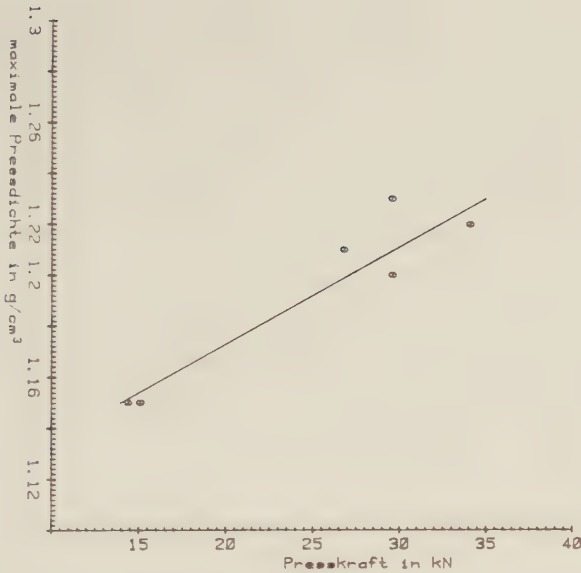


Abb. 65 Maximale Preßdichte in Abhängigkeit von der Preßkraft bei Vollkühlung der Maschine.

Vergleicht man nun die Amylaseaktivitätsverluste der unter Vollkühlung, aber mit verschiedenen Preßkräften hergestellten Tabletten (Abbildung 66) mit $\rho_{\max}$, so zeigt sich, daß die beiden Größen indirekt proportional sind. Dies gilt sowohl für die Werte, die unmittelbar nach der Tablettenherstellung bestimmt wurden, als auch für die Aktivitäten, die ein halbes Jahr, bzw. ein Jahr nach Herstellung, ermittelt wurden. Die Amylaseinaktivierung korreliert also mit dem Volumen, das das Tablettiergut im Augenblick maximaler Verdichtung einnimmt. Somit kann man den Einfluß der aufgewendeten Preßkraft indirekt nachweisen.

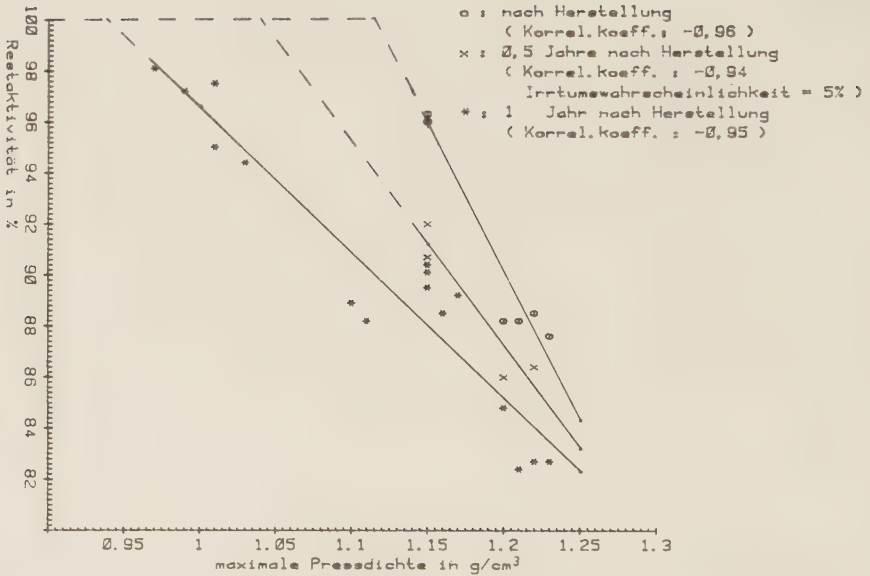


Abb. 66 Zusammenhang zwischen der maximalen Preßdichte und der Amylaseaktivität (Tablettenmaschine gekühlt).

4.5.3. Enzymschädigung als Mehrstufenprozeß

Wie aber ist es zu erklären, daß die Amylaseaktivität nach Herstellung zwar von der Preßtemperatur, nach einem halben Jahr, bzw. einem Jahr Lagerung dagegen nicht mehr von der Preßtemperatur abhängig ist (Abbildung 62)? Zur Interpretation dieses Phänomens kann ein MEHRSTUFENPROZESS für die Enzymschädigung postuliert werden:

- Erster und wichtigster Schritt ist die VERÄNDERUNG DER RÄUMLICHEN ANORDNUNG (44/45/46/98), die im Zusammenhang mit der eben beschriebenen Volumenverringerung steht. Die damit zwangsläufig verbundene Enzymschädigung findet

auch ohne thermische Einwirkung statt und kann nach HÜTTENRAUCH (90) als mechanische Denaturierung bezeichnet werden.

- Durch mechanische Einwirkung geschädigte und thermisch nicht beeinflusste Enzyme (Pressung unter Vollkühlung) zeigen nach Herstellung die Fähigkeit einer partiellen Renaturierung.
- Eine Renaturierung ist nicht mehr möglich, wenn auf die Enzyme zu gleicher Zeit stärkere Preßkräfte oder bei niedrigen Preßkräften höhere Temperaturen einwirken.

4.5.4. Denaturierung - Renaturierung - Denaturierung

Globuläre Proteine werden bei der Tablettierung deformiert und durch gleichzeitig einwirkende thermische Vorgänge denaturiert. Da es bei einer Verpressung unter Kühlung im wesentlichen zu formschlüssigen Bindungen und weniger zu Sinterungserscheinungen kommt, zeigt die α -Amylase in diesem Fall die Fähigkeit sich zu renaturieren. Diese RENATURIERUNG kann

1) in der TABLETTE

oder

2) in einem PHYSIOLOGISCHEN MEDIUM (PUFFER)

erfolgen.

Zu 1): Wird Pankreatin unter Kühlung verpreßt, so ist der Bereich der elastischen Verformung relativ groß. Die globulären Enzyme dehnen sich nach der Kompression wieder aus und erlangen weitgehend die ursprüngliche Gestalt des nativen Proteins zurück. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, daß der Enzymaktivitätsverlust nach Herstellung um so geringer ist, je stärker sich die Tabletten rückdehnen (Abbildung 67).

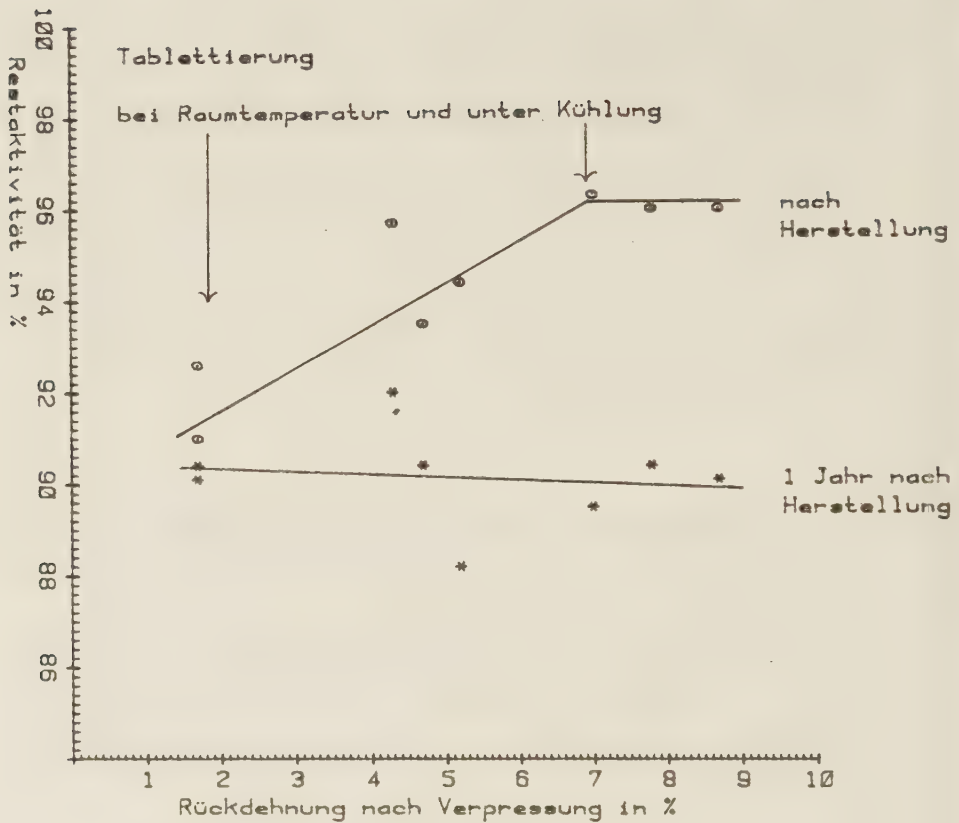


Abb. 67 Amylaseaktivität in Abhängigkeit von der Rückdehnung, unmittelbar und 1 Jahr nach Herstellung. Die untersuchten Tabletten wurden mit gleicher Preßkraft, aber unterschiedlicher Preßtemperatur verpreßt.

Lagert man nun derart renaturierte Enzympräparate, dann stellt man fest, daß trotz der verhältnismäßig geringen Primäreinbußen eine Schädigung - etwa an Knickstellen - induziert sein könnte. Diese wirkt sich erst nach Lagerung aus und führt dann

sekundär zu Werten, die bereits nach Herstellung für die bei Zimmertemperatur verpreßten Tabletten nachgewiesen wurden. Die Enzyminaktivierung würde dann sowohl bei gekühlter als auch bei ungekühlter Verpressung nur von der Zahl der Knickstellen abhängen und nach Lagerung unabhängig von der Preßtemperatur gleiche Beträge annehmen.

Zu 2): Werden mechanisch und thermisch verformte Enzyme bei der Aktivitätsbestimmung in ein physiologisches Medium (Phosphatpuffer) gebracht, so zeigen die unter Kühlung mechanisch verformten Enzyme nach Herstellung die Fähigkeit, sich zu renaturieren (Abbildung 76) (40/98/99); die mechanisch und thermisch stärker geschädigten Enzyme besitzen diese Eigenschaft aufgrund irreversibler Verformung nicht mehr.

Die nur mechanisch verspannten Proteine verlieren allerdings im Zuge der Lagerung ihre Fähigkeit zur Renaturierung, da sich die Enzymaktivitäten der unter verschiedenen Temperaturen gewonnenen Chargen angleichen.

Ähnliche Vorstellungen wurden bereits von FÜHRER und M.L. MÜLLER für das Linearkolloid Cellulose beschrieben. Dabei gehen die Autoren von der Annahme aus, daß die Celluloseeteilchen bei der Tablettierung geknickt werden. Beim Zerfall der Komprimierte in Wasser richten sich diese Bereiche starker Kristallisationsstörungen unter leichter Quellung wieder auf, also sie renaturieren. Durch Alterung verliert eine solche Knickstelle allerdings ihre Spannungen; sie "gewöhnt" sich an die Verformung, indem es im Gefüge zu geringfügigen Korrekturen kommt (70/80). Ein solches Verhalten würde auch den Aktivitätsverlust der α -Amylase bei Lagerung erklären.

4.6. Energetische Vergleichsuntersuchungen

Die Inaktivierung der α -Amylase bei Verpressung ist, wie oben dargelegt, von mechanischen Einflüssen abhängig. Allerdings war bisher nur von der Preßkraft die Rede; energetische Aspekte blieben der Klarheit wegen ausgeklammert. Sie mußten das Ziel weiterführender Untersuchungen sein.

4.6.1. Beurteilung des Tablettierverhaltens an Hand von Kraft-Weg- und Kraft-Zeit-Diagrammen

Grundlagen

Bekanntlich ermöglicht die Aufzeichnung eines Kraft-Weg-Diagramms unter definierten Bedingungen tiefere Einblicke in den Kompressionsvorgang. Voraussetzung dafür ist in jedem Fall der Einsatz einer instrumentierten Tablettenpresse, mit der die Preßparameter

- Preßkraft
- Oberstempelweg und
- Zeit

erfaßt werden können.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine mit Dehnungsmeßstreifen (DMS) und induktivem Weggeber ausgerüstete Exzenterpresse (Exakta 1) eingesetzt. Sie war mit facettierten 13 mm Stempeln ausgerüstet. Preßkraft und Oberstempelweg wurden als Analog-Signale auf Magnetband aufgezeichnet und zur Überprüfung zusätzlich mit Hilfe eines Zwei-Kanal-Speicher-Oszillographen verfolgt. Die Auswertung der auf Magnetband gespeicherten Signale erfolgte nach Analog/Digital-Wandlung und Eingabe in den Prozeßrechner MINC 11. Jeweils 5 Preßzyklen wurden gemittelt und die Spannungssignale mit Hilfe von Eichgeräten für

- 1) Brückenausgangsspannung** der DMS-Vollbrücke als Funktion der Preßkraft,
- 2) Brückenausgangsspannung der Weg-Aufnehmer-Halbbrücke*** als Funktion des Oberstempelwegs umgerechnet.

Durch numerische Integration des KRAFT-WEG-DIAGRAMMS konnten die Energiebeträge für E_{gesamt} und E_2 erhalten werden.

Die Teilflächen E_1 und E_3 wurden über die Beziehung:

$$E_{\text{gesamt}} = E_1 + E_2 + E_3$$

berechnet (32) (Abbildung 69).

** Die Eichgeraden zur Berechnung von Ober- und Unterstempel-preßkräften werden vom Hersteller der Tablettenpressen mitgeliefert.

*** Die Eichung erfolgte mit Hilfe einer am Oberstempelhalter befestigten Mikrometer-Abstandslehre in der Weise, daß
 - ausgehend vom unteren Totpunkt des Oberstempels als Brückenkennullpunkt - bei vorsichtigem Hochfahren des Oberstempels über den Kurbeltrieb in Abständen von 20 µm die zugehörigen Brückenausgangsspannungen erfaßt wurden. Die Abhängigkeit von Spannung und Weg erwies sich für sämtliche Eintauchtiefen (Stellung 1 - 12 an der Exzentrerscheibe) als streng linear.

Mittelwert aus 5 Pressungen

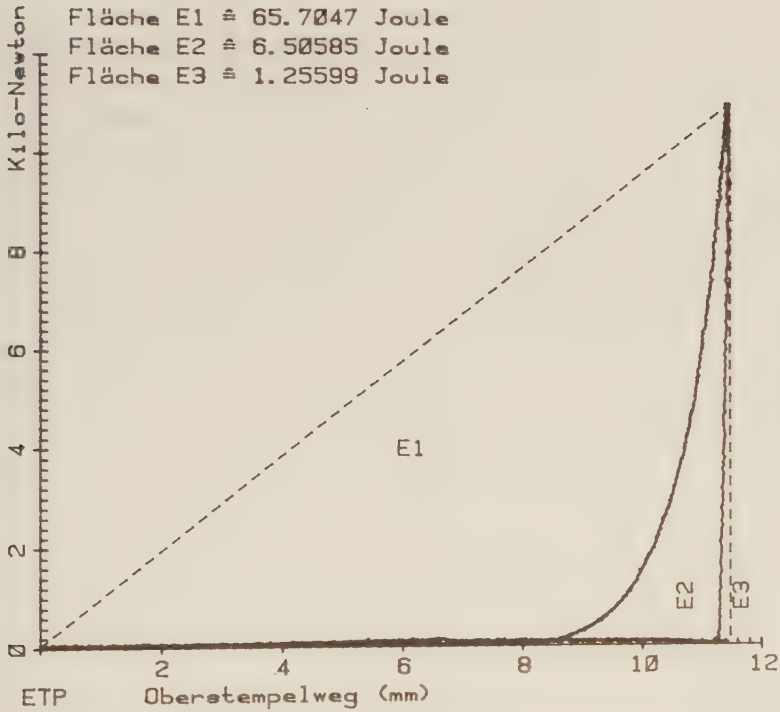


Abb. 69 Vom Prozeßrechner erstelltes Kraft-Weg-Diagramm für Pankreatin-Reinsubstanz (Exzenterpresse).

Neben dem Kraft-Weg-Diagramm konnten Kraft und Weg als Funktion der Zeit dargestellt werden. Als Maß für die Krafthaltezeit wurde die Kraft-Zeit-Kurve vom Rechner integriert:

$$\int_{t_1}^{t_4} F \, dt$$

(Abbildung 72).

Versuchsdurchführung

Die Preßversuche wurden mit jeweils 350 mg nicht granulierter Substanz ohne Hilfsstoffzusatz unter Anwendung verschiedener Preßkräfte durchgeführt. Aufgrund des außerordentlich schlechten Fließverhaltens konnte nur mit einer Tablettiergeschwindigkeit von 3 Hub/min gearbeitet werden. Dazu diente ein starr über die Kurbelachse mit der Tablettenpresse verbundener Elektromotor, welcher auch im Bereich maximaler Preßkraft ein ausreichend hohes Durchzugvermögen besaß.

Unmittelbar nach dem Ausheben der Tabletten durch den Unterstempel konnte die Integraltemperatur berührungslos gemessen werden.

Im Anschluß an die Pressung wurde die Amylaseaktivität und die scheinbare Dichte bestimmt.

Auswertung der erhaltenen Ergebnisse

Die Resultate zeigen Tabelle 9 und 10 (siehe Seite 134).

Tabelle 9 Preßverhalten von Pankreatin bei unterschiedlichen Preßkräften, ermittelt durch quantitative Auswertung der bei der Tablettierung auftretenden Parameter.

Preßkraft (kN)	$\int_1^t F dt^1$	E_{ges}	E_1	E_2	E_3	P_1^2	B/A^3	scheinbare Dichte (g/cm ³)	Amylaseaktivität (FIP-E/mg)
1,4	2,59	10,13	9,25	0,80	0,08	0,91	0,56	0,78	29,4 (- 1 %)
2,5	3,29	16,13	14,62	1,32	0,19	0,87	0,53	0,76	29,7 ($\pm$ 0 %)
11	9,33	73,47	65,70	6,51	1,26	0,84	0,61	1,08	27,4 (- 7,7 %)
18	14,01	106,11	96,19	7,36	2,56	0,74	0,64	1,15	26,1 (-12,1 %)

Ausgangsaktivität: 29,7 FIP-E/mg

- 1 Flächenintegral der Preßkraft-Zeit-Kurve.
- 2 Plastizitätskoeffizient nach STAMM und MATHIS (100), Erklärung im Text.
- 3 Der durch Auswertung der Kraft-Zeit-Kurve erhaltene Quotient B/A ist nach F. MÜLLER (101) ein Maß für die Plastizität des Preßgutes (Erklärung siehe Text).

Mit Hilfe der aufgenommenen Meßdaten konnte nun das Preßverhalten von Pankreatin genauer beschrieben werden. Im einzelnen ergab sich:

- 1) Bei konstanter Preßgeschwindigkeit ist $\int_{t_1}^{t_4} F dt$ direkt proportional zur Preßkraft (Korrelationskoeffizient 0,99).
- 2) Die Amylaseaktivität ist umgekehrt proportional zur scheinbaren Dichte der Tabletten (Korrelationskoeffizient 0,98).
- 3) Mit steigender Preßkraft strebt die Amylaseinaktivierung einem Grenzwert zu. Der im Vergleich zu Abbildung 38 (-2,4 %) höhere Aktivitätsverlust des 11 kN-Versuches (-7,7 %) ist auf das geringere Komprimatgewicht zurückzuführen. Auf dieses Phänomen wird in Kapitel 7 eingegangen.
- 4) Trägt man die Amylaseaktivität gegen E_2 auf, so erhält man oberhalb eines Energiebetrages von ca. 2 J eine lineare Beziehung (Abbildung 73).
- 5) Ein Maß für die Plastizität eines Tablettierguts ist nach STAMM und MATHIS (100) der Quotient:

$$P_1 = \frac{E_2}{E_2 + E_3} \quad \text{Gl. 10}$$

Berechnet man die P_1 -Werte für die am Oberstempel gemessenen Energien (siehe Tabelle 9) so zeigt sich, daß das Proteingemisch im wesentlichen plastisch verformt wird; mit steigender Preßkraft nimmt die elastische Verformung allerdings zu (Abbildung 70).

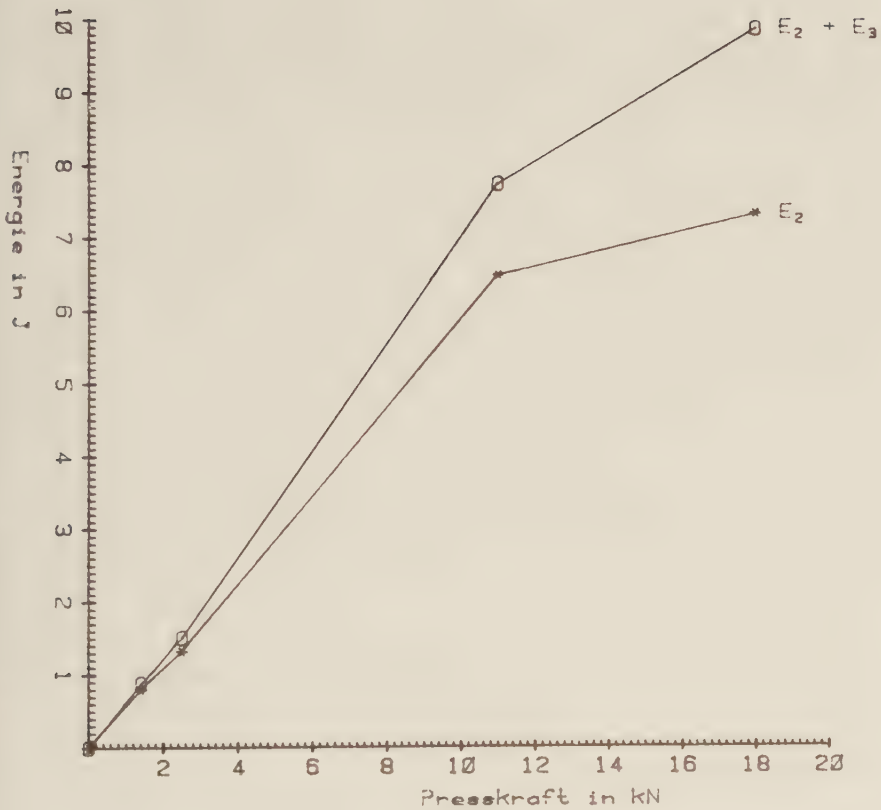


Abb. 70 Die bei der Tablettierung auftretenden Energien E_2 und $E_2 + E_3$ in Abhängigkeit von der angewandten Preßkraft.

- Inwieweit bei den höheren Preßkräften die Fläche E_3 auf eine elastische Stauchung der Preßwerkzeuge bzw. der Maschine zurückzuführen ist, kann mit der verwendeten Meßanordnung nicht beurteilt werden (74).

- 6) Mit zunehmender Preßkraft strebt die Fläche E_2 dem Grenzwert $E_{2\infty}$ zu. Dieser Energiebetrag ist nach DÜRR (71) wie folgt zugänglich:

$$E_2 = \frac{E_{2\infty} \cdot P}{b + P}$$

oder

Gl. 11

$$\frac{P}{E_2} = \frac{b}{E_{2\infty}} + \frac{P}{E_{2\infty}}$$

wobei P = Preßdruck

E_2 = im Preßling umgesetzte mechanische Energie

$E_{2\infty}$ = E_2 für P_{∞}

b = Konstante

Diese Gleichung stellt einen Zusammenhang zwischen dem aus der Preßkraft und der Tablettenoberfläche zugänglichen Preßdruck und der im Preßling verbleibenden mechanischen Energie E_2 her.

Trägt man $\frac{P}{E_2}$ gegen P auf, so erhält man eine Gerade mit der Steigung $1/E_{2\infty}$ und dem Ordinatenabschnitt $b/E_{2\infty}$

(Abbildung 71).

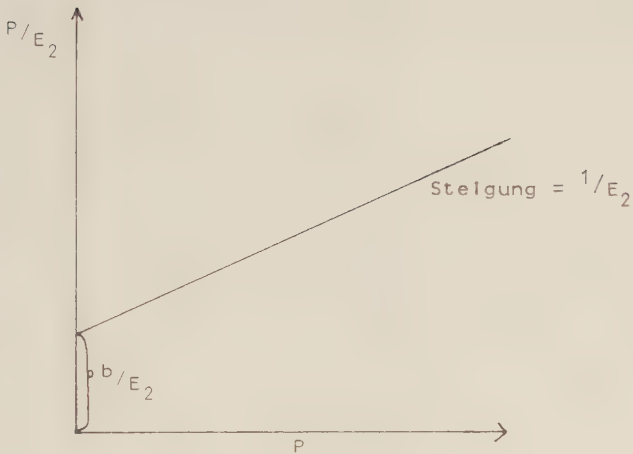


Abb. 71 Graphische Bestimmung von $b/E_{2\infty}$ nach DÜRR (71).

Für das Beispiel Pankreatin ergibt sich:

$$E_{2\infty} = 9,5 \text{ kpm/g} = 93,2 \text{ J/g}$$

$$b = 4250 \text{ kp/cm}^2 = 41,7 \text{ kN/cm}^2$$

$$b/E_{2\infty} = 447,6 \text{ g/m cm}^2 = 447,6 \text{ g/m cm}^2$$

Vergleicht man die von DÜRR für eine Anzahl pharmazeutischer Wirk- und Hilfsstoffe erhaltenen Werte mit den für Pankreatin gefundenen, so kann das Proteingemisch denjenigen Substanzen mit befriedigenden Preßeigenschaften, wie z.B. Tablettose, zugeordnet werden.

- 7) Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung des Tablettierverhaltens einer Substanz besteht in der Auswertung des KRAFT-ZEIT-DIAGRAMMS.

Nach F. MÜLLER (101) kann die Kraft-Zeit-Kurve in drei Abschnitte unterteilt werden (Abbildung 72).

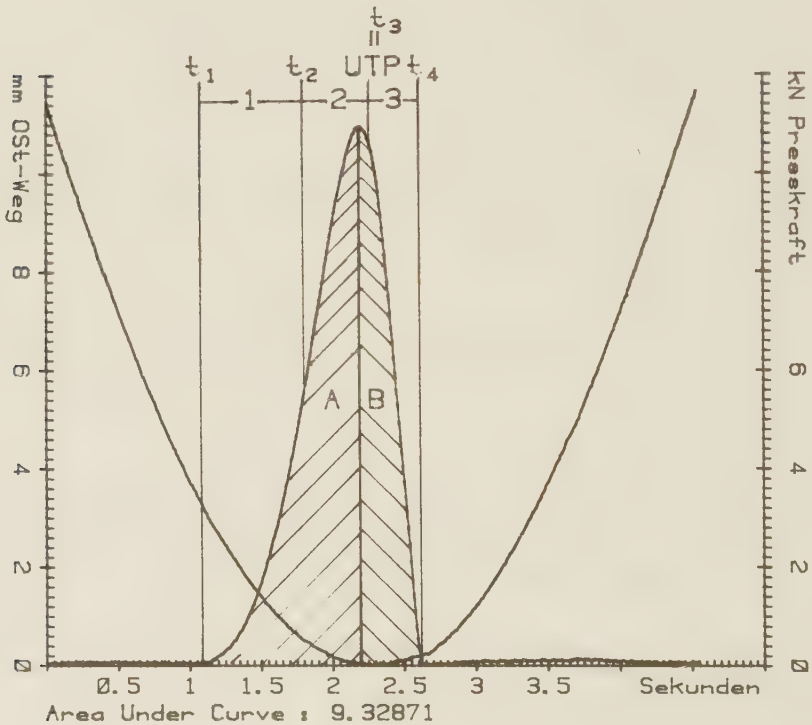


Abb. 72 Vom Prozeßrechner erstelltes Kraft-Zeit- und Weg-Zeit-Diagramm für Pankreatin mit Auswertung nach F. MÜLLER (101).

Im ersten Teil der Kurve, bis zum Abschnitt t_2 wird das Tablettiergut durch Verschiebung der Partikel plastisch verformt. Hier legt der Oberstempel etwa 90 % seines Weges in der Matrize zurück. Der Abschnitt 2 zwischen t_2 und t_3 beschreibt den Bereich um das Kraftmaximum. Nach F. MÜLLER kommt es hier zu Sinterungen, "Kaltschweißung" und anderen Bindemechanismen.

Da die Zeit t_3 mit dem UTP des Oberstempels übereinstimmt, entspricht der Abschnitt 3 der Rückdehnungsphase des Kraft-Weg-Diagramms. Der Kraftabfall erfolgt hier annähernd linear. Interessant ist die Tatsache, daß das Kraftmaximum nicht im UTP des Oberstempels liegt. Es kommt während der Kompressionsphase zu Relaxationserscheinungen im Tablettiergut. Das Material weicht dem Druck des Oberstempels aus (68/74/88/101/102/103).

Für Pankreatin und Trockengranulat N ist der vor dem UTP gemessene Kraftabfall zwar unabhängig von der Preßkraft, aber abhängig von der Preßzeit. Dies bestätigt die Theorie von PARMENTIER (68), wonach dieser Effekt darauf beruht, daß der Oberstempel sich im Bereich des UTP nur relativ langsam bewegt und daß daher im Tablettiergut eine merkbare Spannungsrelaxation ablaufen kann. Bei der unter 3.3.1. beschriebenen Tablettierung von Trockengranulat N auf einer Exzenterpresse (Exakta 1) betrug der Kraftabfall vor dem UTP unabhängig von der Preßkraft für eine Preßzeit von 0,09 s 0,2 kN und für eine Preßzeit von 6,6 s 0,5 kN.

Aus dem Kraft-Zeit-Diagramm sind auch Aussagen über das PLASTISCH-ELASTISCHE VERFORMUNGSVERHALTEN eines Tablettierguts möglich. Bei einer rein elastisch verformbaren Substanz verlaufen Kraftanstieg und Kraftabfall symmetrisch. Dagegen ist einer plastischen Verformung ein ausgeprägt asymmetrischer Kurvenverlauf eigen; fällt man im Kraftmaximum das Lot auf die Abszisse, so erhält man die Flächen A und B, deren Quotient B/A für rein elastische Substanzen den Wert eins haben müßte. Bei plastisch verformbaren Materialien wird A gegenüber B größer; der Quotient $B/A < 1$. Für ideal plastische Verformung geht er gegen null (Abbildung 72).

Für die Tablettierung von Pankreatin mit verschiedenen Preßkräften errechnen sich B/A -Werte (siehe Tabelle 9), die analog zu der Auswertung des Kraft-Weg-Diagramms nach DÜRR (71) im Bereich der Tablettose liegen. Darüber hinaus zeigt sich

- entsprechend den P_1 -Werten -, daß die elastische Verformung mit steigender Preßkraft zunimmt.

Resultat

Pankreatin hat, wie ein Vergleich der erhaltenen Daten (P_1 -Wert, b , E_{20} , B/A) zeigt, befriedigende Preßeigenschaften. Es ist unter Normalbedingungen im wesentlichen plastisch verformbar. Die Ergebnisse aus dem Kraft-Weg-Diagramm stimmen dabei sehr gut mit denen des Kraft-Zeit-Diagramms überein. Zur Beurteilung des Tablettierverhaltens einer Substanz sollte daher auch die Kraft-Zeit-Kurve herangezogen werden.

Die plastische Verformbarkeit ist für die schon bei verhältnismäßig niederen Preßkräften resultierende enorme Härte der Preßlinge verantwortlich. Preßkräfte in der Größenordnung von 10 kN (75 MPa) reichen aus, um ausreichend feste Tabletten mit einer Friabilität von $< 0,1 \%$ zu erhalten (siehe Tabelle 19 Anhang). Mit steigender Preßkraft und steigendem E_2 nimmt die Amylaseaktivität ab.

Welche Bedeutung die dem Pankreatin mechanisch zugeführte Energie E_2 gegenüber einer thermischen Belastung mit entsprechendem Energiebetrag hat, zeigten weiterführende Versuche.

4.6.2. Mechanische und thermische Energiebeträge

Wie bereits erwähnt, wird bei der Tablettierung dem Preßgut die Energie $E_2 + E_3$ zugeführt. Während der Teilbetrag E_3 nach der Komprimierung als elastische Energie wieder an den Oberstempel abgegeben wird, erfolgt bei der MECHANISCH ZUGEFÜHRTEN ENERGIE E_2 zu 90 % eine Umwandlung in THERMISCHE ENERGIE (68/70) und soweit sie nicht in der Tablette selbst verbleibt, wird sie an die Tablettenmaschine abgegeben (siehe 4.4.6.).

Um einer Masse m die Wärmeenergie $Q = E_2^{**}$ zuzuführen, muß sie um die Temperatur ΔT erwärmt werden.

Die Äquivalenz von mechanischem und thermischem Energiebetrag ergibt sich nach:

$$\frac{m}{x} \cdot E_2 = \Delta T \cdot c_p \cdot m = Q \quad (J) \quad \text{Gl. 12}$$

oder

$$\Delta T = \frac{E_2}{c_p \cdot x}$$

mit E_2 = mechanisch zugeführte Energiemenge (J)

Q = Wärmeenergie (J)

ΔT = Temperaturdifferenz (K)

c_p = spezifische Wärme bei konstantem Druck (J/g · K)

$\bar{x}$ = Mittelwert der Tablettenmasse (g)

m = Probeneinwaage

Um ΔT zu berechnen, muß also der c_p -Wert von Pankreatin bestimmt werden. Anstelle einer aufwendigen kalorimetrischen c_p -Bestimmung konnte durch eine DTA-Analyse (c_p -Programm) mit on-line angeschlossenem Tischrechner bequem die spezifische Wärme von Pankreatin ermittelt werden. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in (76).

** Bei der folgenden Betrachtung wurde von der Annahme ausgegangen, daß 100 % der mechanisch zugeführten Energie E_2 in thermische Energie Q umgewandelt werden.

Der c_p -Wert ist temperaturabhängig. Für die Erwärmung von Pankreatin von 297 K (24 °C) auf 313 K (40 °C) ergibt sich aus drei Bestimmungen ein Mittelwert* von:

$$c_p = 1,5 \text{ J g}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

Setzt man diesen Wert in obige Gleichung ein, so erhält man die in Tabelle 10 angegebenen Daten für ΔT .

Mittels des DTA- c_p -Programmes ist es nun umgekehrt möglich, eine bestimmte Pankreatinmasse m um die berechneten Temperaturen ΔT , die dem jeweilig gemessenen Wert E_2 entspricht, zu erwärmen, d.h. ihr die Wärmeenergie

$$Q = \frac{E_2 \cdot m}{\bar{x}} \quad \text{Gl. 13}$$

zuzuführen.

Nach der entsprechenden thermischen Belastung des Pulvermaterials wurden die Amylaseaktivitäten bestimmt (Abbildung 73).

Wie Abbildung 73 zeigt, ergibt sich bei rein thermischer Belastung (2) keine Amylaseinaktivierung. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß die MECHANISCHEN VORGÄNGE bei der Tablettierung von PRIMÄRER BEDEUTUNG für die Enzyminaktivierung sind, während thermische nur sekundären Charakter haben.

* Die Einzelwerte stimmten bis zu zwei Dezimalstellen überein.

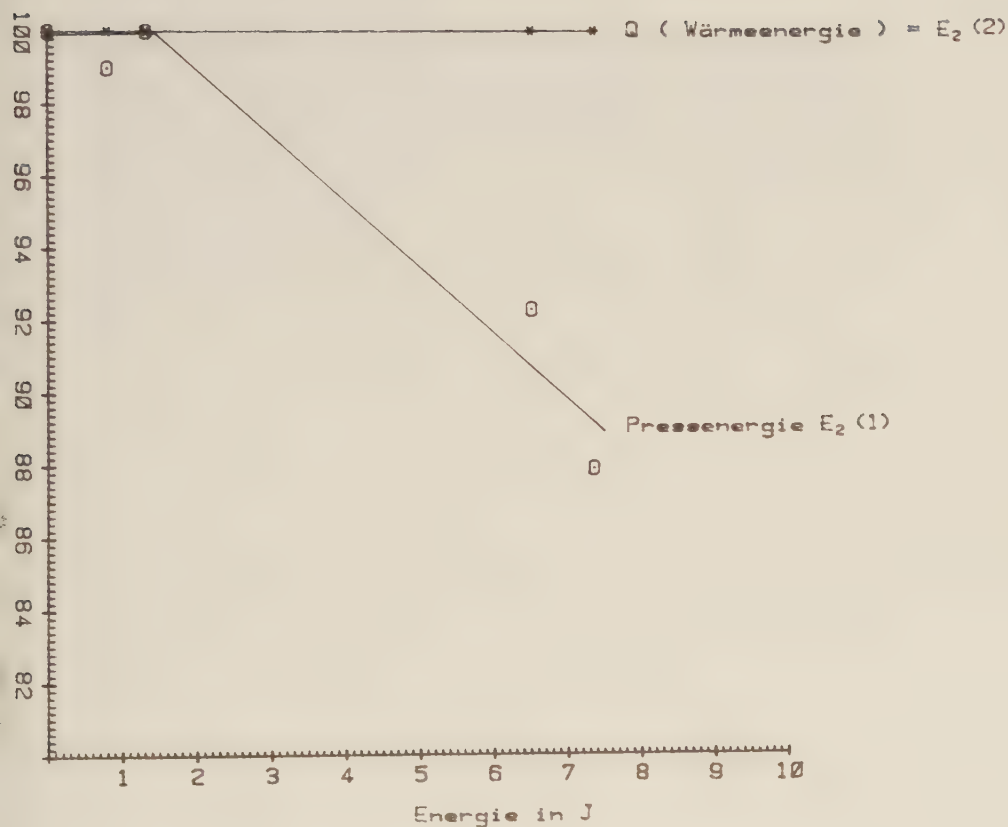


Abb. 73 Amylaseaktivität (Ausgangsaktivität: 29,7 FIP-E/mg) nach

- MECHANISCHER und THERMISCHER Belastung (1) auf einer vollinstrumentierten Exzenterpresse (Exacta 1)
- REIN THERMISCHER (2) Belastung von Pankreatin in der DTA-Apparatur mit entsprechenden Energiemengen.

Die errechneten Temperaturen entsprechen zugleich denjenigen Werten, die erreicht werden müßten, wenn bei der Tablettierung

100 % der mechanisch zugeführten Energie in thermische Energie umgewandelt werden würden. Im Vergleich dazu sind die unter den Versuchsbedingungen gemessenen Temperaturen und die daraus bestimmbare, freiwerdende Wärmeenergie Q_{real} in Tabelle 10 aufgeführt.

Der Quotient $\frac{Q_{\text{real}}}{E_2} \cdot 100$ gibt den Prozentsatz mechanischer Energie an, der als thermische Energie wiedergefunden wurde.

Tabelle 10 Vergleich der umgesetzten mechanischen Energie (E_2) mit der als Wärme wiedergefundenen Energie Q_{real} .

E_2 (J)	ΔT^1 für $Q = E_2$	ΔT gemessen	Q_{real}^2	$\frac{Q_{\text{real}}}{E_2} \cdot 100$
0,8	1,4 K	0,4 K	0,22 J	27,5 %
1,32	2,4 K	0,5 K	0,28 J	21,2 %
6,51	11,7 K	1,4 K	0,78 J	12,0 %
7,36	13,6 K	2,0 K	1,09 J	14,8 %

1) Temperaturerhöhung ΔT der Preßlinge für den Fall, daß 100 % der umgesetzten mechanischen Energie E_2 in Wärmeenergie Q umgewandelt würden.

2) Wiedergefundene Wärmeenergie Q_{real} , errechnet gemäß Gleichung 12 aus ΔT gemessen.

Die relativ große Differenz zwischen den nach der beschriebenen Methode gefundenen Q_{real} -Werten (10 - 30 %) und den von PARMENTIER angegebenen Beträgen in Höhe von ca. 90 % dürfte auf der relativ langsamen Tablettiergeschwindigkeit beruhen (32). Dennoch ist eine Beobachtung bemerkenswert: Der Prozentsatz an wiedergefundener thermischer Energie wird mit steigendem E_2 kleiner. Selbst wenn man die bei der Messung auftretenden Fehlerquellen berücksichtigt, deutet dies darauf hin, daß die bei höheren Preßenergien berechneten Temperaturen zunehmend zur Matrixbildung der Tablette verbraucht werden.

4.7. Zusammenfassung von Kapitel 4

Das Proteingemisch Pankreatin wird bei der Verpressung sowohl auf Exzenterpressen als auch auf Hochleistungsrundlaufpressen durch mechanische und thermische Einflüsse geschädigt. Mittels technologischer Parameter kann die Ursache für die Enzyminaktivierung sehr gut interpretiert werden:

Auftretende α -Amylaseaktivitätsverluste in Höhe von maximal 15 % sind primär durch die mechanische Deformation bedingt. Findet die Tablettierung bei ZIMMERTEMPERATUR statt, so wird die Proteindeformation durch thermisch bedingte Fusionsvorgänge irreversibel manifest. Verpreßt man hingegen unter KÜHLUNG, unterbleibt die Fuslon, die Tabletten dehnen sich nach der Kompression wieder aus und ergeben eine weniger kompakte Matrix. Die Enzymdeformation ist also in gewissem Ausmaß reversibel; es kommt zu einer Renaturierung des Proteins. Unter Kühlung hergestellte Tabletten zeigen daher unmittelbar nach der Tablettierung eine höhere Aktivität als bei Zimmertemperatur verpreßte. Interessant ist die Feststellung, daß die reaktivierten Enzyme bei Lagerung denaturiert werden, d.h. ein halbes Jahr nach Herstellung gleichen sich die Enzymaktivitäten der bei gleicher Preßkraft gewonnenen Komprime an.

Eine quantitative Erfassung und Auswertung der bei der Tablettierung auftretenden physikalischen Größen wie Preßkraft F , Preßenergie E_2 und E_3 und Temperaturerhöhung ΔT zeigt, daß Pankreatin im Sinne einer "Matrixbildung" befriedigende Preßeigenschaften besitzt. Das Proteingemisch ist im Gegensatz zu anderen makromolekularen Stoffen wie Stärke und Cellulose vorwiegend plastisch verformbar.

5. Biochemie der Inaktivierung

Preßt man bei verschiedenen Temperaturen, aber mit gleicher Preßkraft, so tritt nach einem halben Jahr ein Aktivitätsverlust von ca. 10 % auf, von dem ca. 6 % auf eine mechanische Primärdeformation zurückgeführt werden konnten; als Ursache für die zweiten 4 % kann angesichts der einwirkenden Preßkräfte die Spaltung von Peptidbindungen diskutiert werden. Dies insbesondere, da es bei der Tablettierung zu Scherungs-, Reibungs- und Bruchvorgängen kommt (49/59/60) und Modellversuche, bei denen Pankreatin in einer Kugel- bzw. RETSCH-Mörsermühle durch Schlag, Prall und Scherung beansprucht wurde, zu einem erheblichen Enzymaktivitätsverlust führten (siehe 3.3.2.).

Ziel weiterführender Untersuchungen sollte es daher sein, festzustellen, ob nach definierter mechanischer Beanspruchung des Ausgangsmaterials eine FRAGMENTIERUNG beobachtet werden kann. Dazu wurden GELELEKTROPHORETISCHE und GELFILTRATIONS-CHROMATOGRAPHISCHE Untersuchungen durchgeführt.

5.1. Disk-elektrophoretische Untersuchungen

Bekanntlich versteht man unter Elektrophorese die Bewegung geladener Partikel in einem wässrigen System unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes. Da sich verschiedene Proteine meist charakteristisch in Größe und Ladung unterscheiden, ist die Elektrophorese zur Proteinuntersuchung vorzugsweise geeignet. Abbildung 74 zeigt diejenigen Parameter, die für elektrophoretische Beweglichkeit eines Proteins maßgebend sind (52/104).

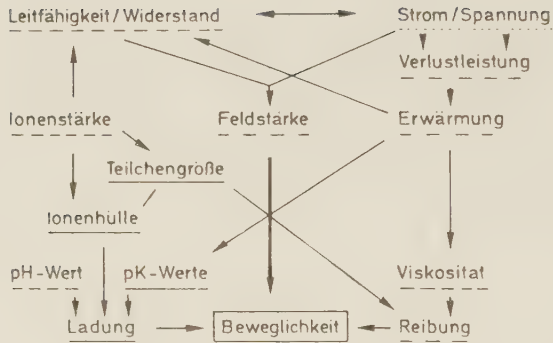


Abb. 74 Abhängigkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit eines Proteins von einigen wichtigen Parametern und deren gegenseitige Beeinflussung.

---- = mittelbare oder unmittelbare Eigenschaften des Puffers,

— = des Proteins und

.... = der Stromquelle.

--- = mischfunktionelle Effekte (52)

Heute hat sich die Trägerelektrophorese auf Polyacrylamidgelen durchgesetzt.

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden nach dem Prinzip der DISK-ELEKTROPHORESE durchgeführt.

5.1.1. Methode

Bei der Disk-Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen unterscheidet man zwischen dem WEITMASCHIGEN SAMMELGEL und dem ENGMASCHIGEN TRENNGEL (siehe Abbildung 75 und Anhang).

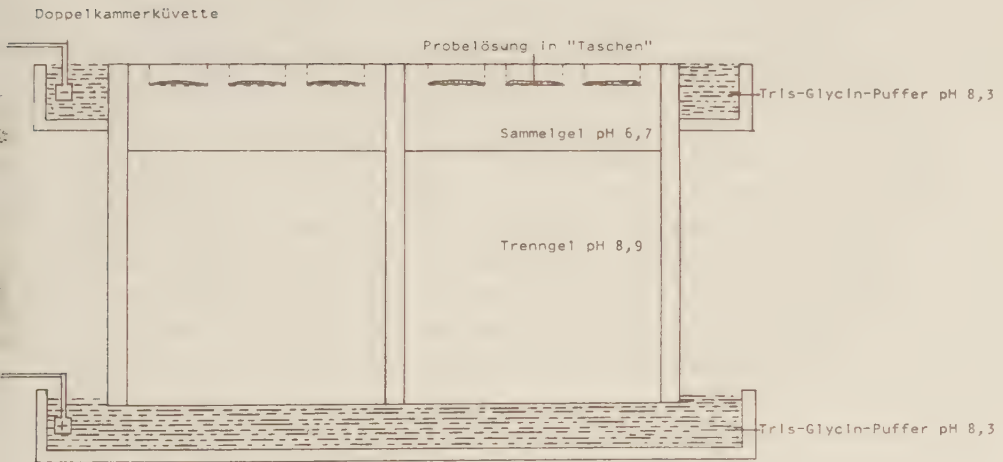


Abb. 75 Anordnung für eine senkrechte Disk-Elektrophorese auf Trärgelen.

Vor der eigentlichen Trennung im Trenngel kommt es im Sammelgel zu dem sogenannten KONZENTRIERUNGSEFFEKT. Hierbei wird die in die "Taschen" aufgetragene Proteinprobe zwischen einem Leitton-Chlorid und einem Folgeion-Glycinat in Banden fokus-

siert. Da Siebeffekte fehlen, ordnen sich unter dem Einfluß der Feldstärke die Proteine gemäß ihrer Beweglichkeit dicht hintereinander in scharfen Zonen an, die in das eigentliche Elektrophoresegel (Trenngel) einwandern. Dieses hat einen anderen pH-Wert, in dem die Folgeionen (Glycinat) nun eine höhere Beweglichkeit gewinnen als die Proteine. Letztere werden also überholt und befinden sich jetzt in einem homogenen elektrischen Feld, in welchem eine normale elektrophoretische Trennung stattfindet.

Um eine exakte Zonenbildung der Proteine zu erhalten, wurden Trenngele mit einem Gradienten von 5,6 zu 11,2 % Acrylamidkonzentration eingesetzt. Die einzelnen Moleküle werden also nicht nur nach ihrer elektrischen Gesamtladung, sondern auch nach Größe (Molekulargewicht) und Gestalt (Quartärstruktur) getrennt (Molekularsiebeffekt).

Auf Dünnschichtgelen konnten pro Lauf drei mal zwei Proben (Doppelkammer) getrennt werden. Die eine Hälfte wurde mit COOMASSIE BRILLIANT BLAU R 250 unspezifisch auf Proteine POSITIV angefärbt. Bei der zweiten Hälfte der Proben wurde mittels einer speziellen NEGATIV-FÄRBUNG nur das Gel, nicht dagegen die α -AMYLASE angefärbt.

Die hier aufgeworfene Frage bezieht sich in erster Linie auf α -Amylaseabbauprodukte, die keine enzymatische Aktivität aufweisen, so daß diese bei der Negativfärbung nicht unmittelbar sichtbar, sondern eventuell nur an einer geringen Bandbreite intakter α -Amylase erkannt werden können. Die Positivfärbung müßte allerdings bei einer Depolymerisation der galenisch beanspruchten Proben stärkere oder zusätzliche Banden im niedermolekularen Bereich ergeben.

Um weitergehende Aussagen zu ermöglichen, mußte neben mechanisch auch thermisch geschädigtes Pankreatin untersucht werden. Im einzelnen handelt es sich um folgende Proben:

α -Amylaseaktivitätsverlust

1) Pankreatin, Ausgangsmaterial	0 %
2a) Pankreatin, thermisch durch trockenes Erhitzen geschädigt (15 min 343 K/70 °C)	10 %
2b) (6 min 373 K 100 °C)	99 %
3) Pankreatin, auf einer KBr- Presse bei 55 MPa verpresst	12 %
4) Pankreatin, 50 Stunden in ei- ner Kugelmühle vermahlen	63 %

Die Muster werden in 0,01 M Sörensenpuffer, pH 6,8, suspendiert, die Suspension zentrifugiert und die erhaltene Lösung mit Glycerol und Bromphenolblau vermischt. 50 μ l dieser Mischung werden in die "Taschen" des Sammelgels appliziert. Dies entspricht einer Enzymaktivität bei nativem Pankreatin von 14 FIP Amylaseeinheiten. Die Trennung der Proteine erfolgte senkrecht in einer im Institut für Physiologische Chemie, Erlangen, selbstkonstruierten Apparatur**.

5.1.2. Untersuchungsergebnisse

Abbildung 76 und 77 zeigen die positiv und negativ gefärbten Trenngele.

** Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Aschoff, der die elektrophoretischen Arbeiten durchführte.

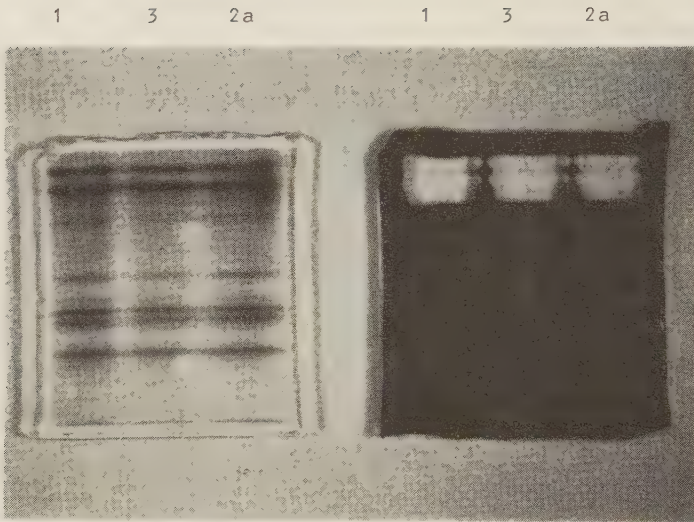


Abb. 76 Disk-Elektrophorese von Pankreatin

	α -Amylaseaktivitätsverlust
- unbehandelt (Muster 1)	0 %
- mechanisch denaturiert (Muster 3)	12 %
- thermisch denaturiert (Muster 2a)	10 %
(von links nach rechts)	

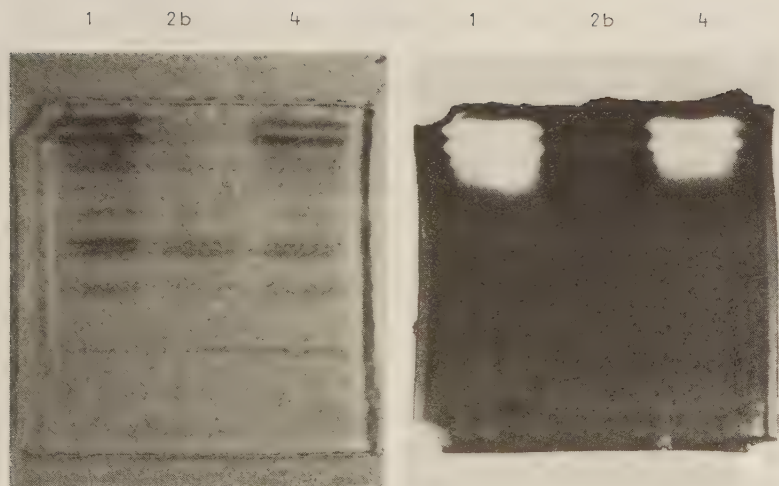


Abb. 77 Disk-Elektrophorese von Pankreatin

	α -Amylaseaktivitätsverlust
- unbehandelt (Muster 1)	0 %
- thermisch denaturiert (Muster 2b)	99 %
- mechanisch denaturiert (Muster 4)	63 %

Eindeutig ist zu erkennen:

- Bei einer mechanischen und thermischen Schädigung um ca. 10 % tritt keine Veränderung im Proteinmuster auf; positive und negative Färbung entsprechen - abgesehen von einer etwas geringeren Intensität der Muster 3 und 2a - der des aktiven Pankreatins. Zersetzungsbedingte Bruchstücke sind nicht feststellbar.

- Bei einer mechanischen oder thermischen Inaktivierung um 63 bzw. 99 % beobachtet man sowohl bei der Negativfärbung als auch bei der Positivfärbung eine deutliche Verringerung der α -Amylasebanden, ohne daß jedoch bei der Positivfärbung im Bereich der niedermolekularen Produkte eine Intensivierung bestehender Banden oder das Auftreten zusätzlicher Substanzen stattfindet.
- Die Erscheinung, daß die inaktivierten Muster einerseits keine Depolymerisationsprodukte, andererseits aber eine geringere Intensität aufweisen, kann auf eine durch den schädigenden Einfluß hervorgerufene Koagulation zurückgeführt werden. Das Koagulat besitzt eine geringere Löslichkeit und wird im Zuge der erforderlichen Zentrifugation abgetrennt. Diese Vorstellungen sind in der folgenden schematischen Darstellung zusammengefaßt.
- Bei der spezifischen Amylaseaktivitätsfärbung (Negativfärbung) fiel auf, daß mehrere Banden auftreten; auch die unspezifische Färbung (Positivfärbung) zeigt mindestens 4 Banden im Bereich der α -Amylase. Sie sind ein Anzeichen dafür, daß die α -AMYLASE aus Pankreatin eine QUARTÄRSTRUKTUR mit 4 enzymatisch aktiven Untereinheiten ausbildet (15/48/105/106/107/108). Näheres hierzu siehe Anhang.

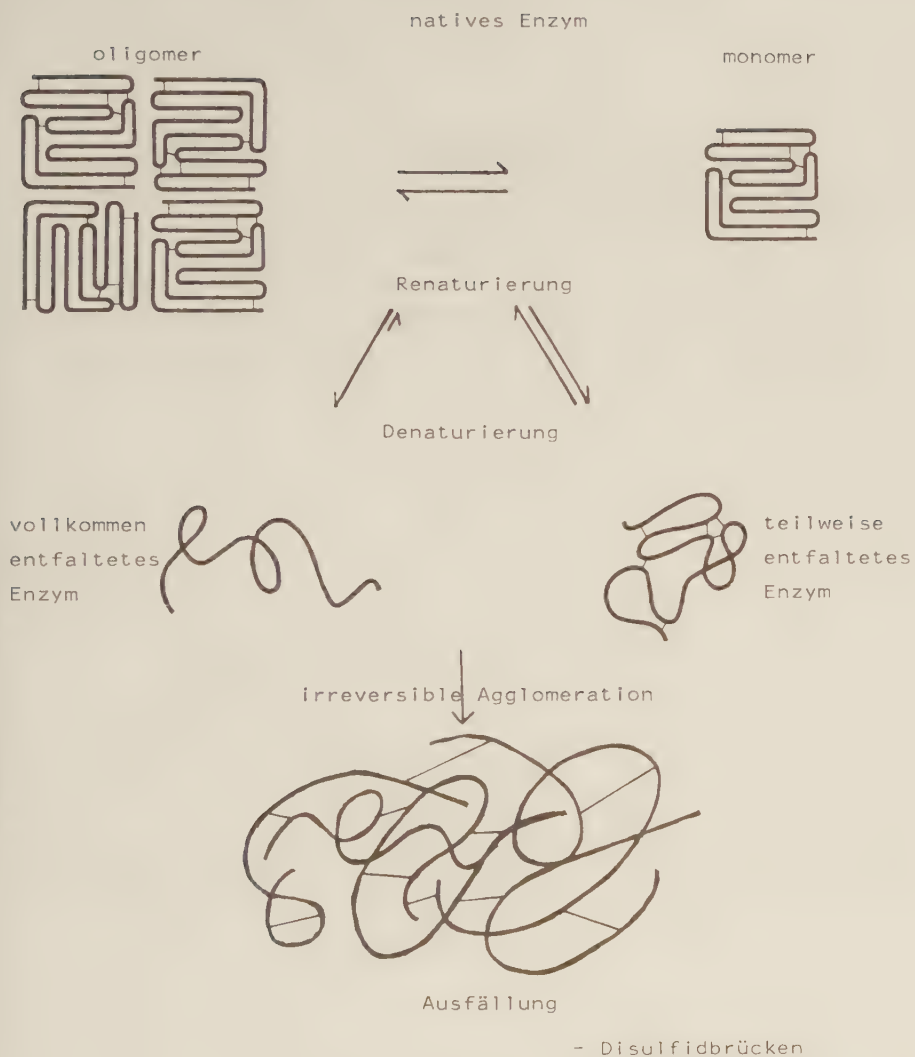


Abb. 78 Schematische Darstellung der Inaktivierung eines oligomeren Enzyms im Zuge thermischer und mechanischer Denaturierung.

5.2. Gelfiltrationschromatographische Untersuchungen

Parallel zu den gelelektrophoretischen Arbeiten wurde der Versuch unternommen, mittels GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE - auch als Ausschlußchromatographie bezeichnet - unter den Bedingungen der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Unterschiede in der MG-Verteilung der unter 5.1.1. aufgeführten Proben zu bestimmen.

5.2.1. Methode

Abweichend zu 5.1.1. wurden die Proben in 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8, d.h. denjenigen Puffer, der auch bei der Amylaseaktivitätsbestimmung Verwendung findet, suspendiert und nach Zentrifugation 1 : 10 mit einer 5 mM NaCl-Lösung verdünnt.

Derart hergestellte Lösungen zeigten nur geringe Unterschiede in ihren UV-Spektren*, so daß auch stark denaturierte Produkte UV-photometrisch gut bei 280 nm detektiert werden konnten. Chromatographiert wurde auf einer LiChrospher® 500 Diol-Säule, MERCK, die für eine Molekulargewichtsfractionierung im Bereich von 4 000 - 700 000 geeignet ist (13/109/110/111/112).

5.2.2. V Versuchsergebnisse

In den Abbildungen 79 und 80 sind die erhaltenen Chromatogramme dargestellt.

*: Derartige Unterschiede sind im allgemeinen klein und können nur durch die Aufzeichnung von Differenzspektren sichtbar gemacht werden.

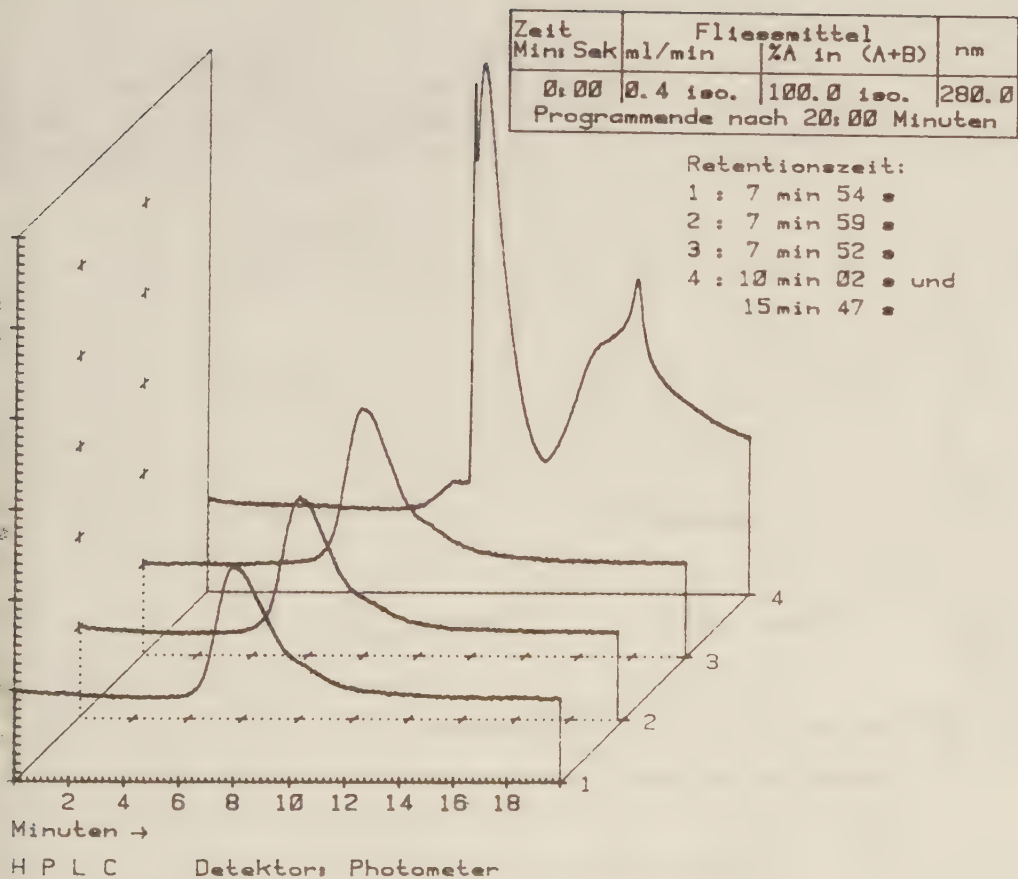


Abb. 79 Gelchromatogramme von Pankreatin.

 α -Amylaseaktivitätsverlust

- | | |
|---|-------|
| 1) thermisch denaturiert
(Muster 2b) | 99 % |
| 2) thermisch denaturiert
(Muster 2a) | 10 % |
| 3) unbehandelt (Muster 1) | 0 % |
| 4) mit 1 n HCl hydrolysiert
(30 min/295 K/22 °C) | 100 % |

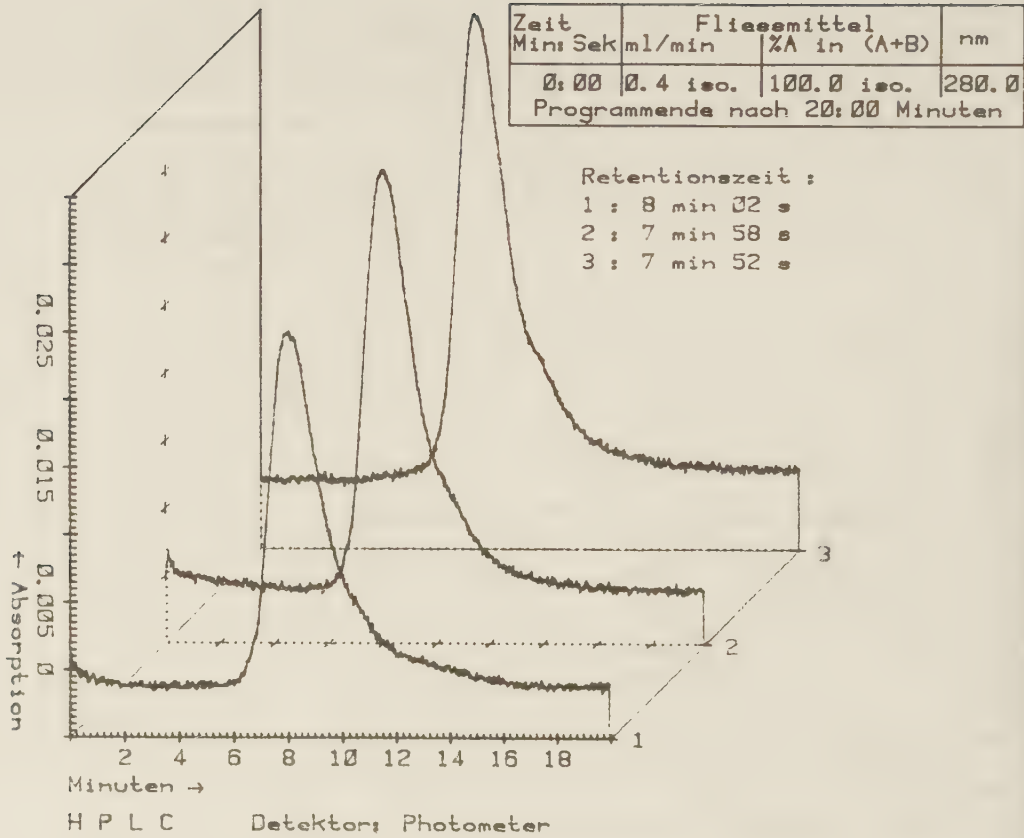


Abb. 80 Gelchromatogramme von Pankreatin.

 α -Amylaseaktivitätsverlust

- | | |
|---|------|
| 1) mechanisch denaturiert
(Muster 4) | 63 % |
| 2) mechanisch denaturiert
(Muster 3) | 12 % |
| 3) unbehandelt (Muster 1) | 0 % |

Es zeigt sich

- die MG-Verteilung der nach thermischer und mechanischer Inaktivierung löslichen Pankreatinproteine stimmt praktisch mit der des nativen Pankreatins überein.
- Die Gelfiltrationschromatographie (GFC) unter den Bedingungen der HPLC ist bei weitem nicht so empfindlich wie die Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese.

Die Aussagefähigkeit der Methode wurde durch eine Probe hydrolytisch gespaltenen Pankreatins überprüft. Dieses mit 1 n HCl (30 min, 295 K/22 °C) abgebaute Protein zeigte diskrete Peaks nach 10 min 2 s und 15 min 47 s. Ein hydrolytischer Abbau durch die angewendete mechanische und thermische Denaturierung kann somit ausgeschlossen werden (9).

5.3. Diskussion

Die GFC zeigt, daß bei mechanischer und thermischer Belastung sich das MG der in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 6,8, gelösten Anteile nur unwesentlich nach kleineren Werten hin verschiebt. Absolute MG-Werte interessierten in diesem Zusammenhang nicht, da nur die Frage einer möglichen Depolymerisation geklärt werden sollte.

Wie die Disk-Elektrophorese ferner zeigt, ist die Amylaseinaktivierung bei mechanischer und thermischer Belastung nicht auf die Spaltung von Peptidbindungen zurückzuführen; es sind keine löslichen Bruchstücke festzustellen.

Eine Depolymerisation durch die Verpressung spielt also für die Enzyminaktivierung praktisch keine Rolle.

Es sei angemerkt, daß bei dem Linearkolloid Cellulose von GERST (113) nachgewiesen werden konnte, daß es zwar bei längerer Mahlung in der Kugelmühle zu einer zeitabhängigen Abnahme des Polymerisationsgrades kommt, indessen bewirken kürzer einwirkende mechanische Kräfte, wie sie bei der Tablettierung auftreten, keinen Kettenbruch.

Deformationserscheinungen können bei Proteinen mittels DIFFERENZSPEKTREN* "sichtbar" gemacht werden. Treten bei der Denaturierung von Proteinen Konformationsänderungen auf, so sind diese im Absorptionsspektrum des geschädigten Enzyms nachweisbar (114/115/116/117/118):

* Im ultravioletten Spektralbereich ist für Proteine die Region von 250 bis 310 nm von besonderem Interesse. Hier absorbieren Phenylalanyl-, Tyrosyl- und Tryptophanyl-Reste (40). Sterische Änderungen in der Nachbarschaft solcher chromophorer Gruppen kann man im Absorptionsspektrum erkennen. Die beobachteten Veränderungen sind gewöhnlich gering und können am genauesten in Form eines Differenzspektrums ermittelt werden. Dabei wird in einem 2-Strahl-UV-Photometer direkt die Absorptionsdifferenz zwischen der Lösung des nativen und der des denaturierten Proteins bestimmt. Einflüsse durch pH-Wert-Verschiebungen, Temperatur- und Druckerhöhung sind somit bequem zu erkennen (119).

- 3 : Pankreatin - Pankreatin
 1 : Pankreatin - therm. gesch. Pank. (-10%)
 2 : Pankreatin - mech. gesch. Pank. (-12%)
 (verpresst)
 3 : Pankreatin - therm. gesch. Pank. (-99%)
 4 : Pankreatin - mech. gesch. Pank. (-63%)
 (tribomechanisch)

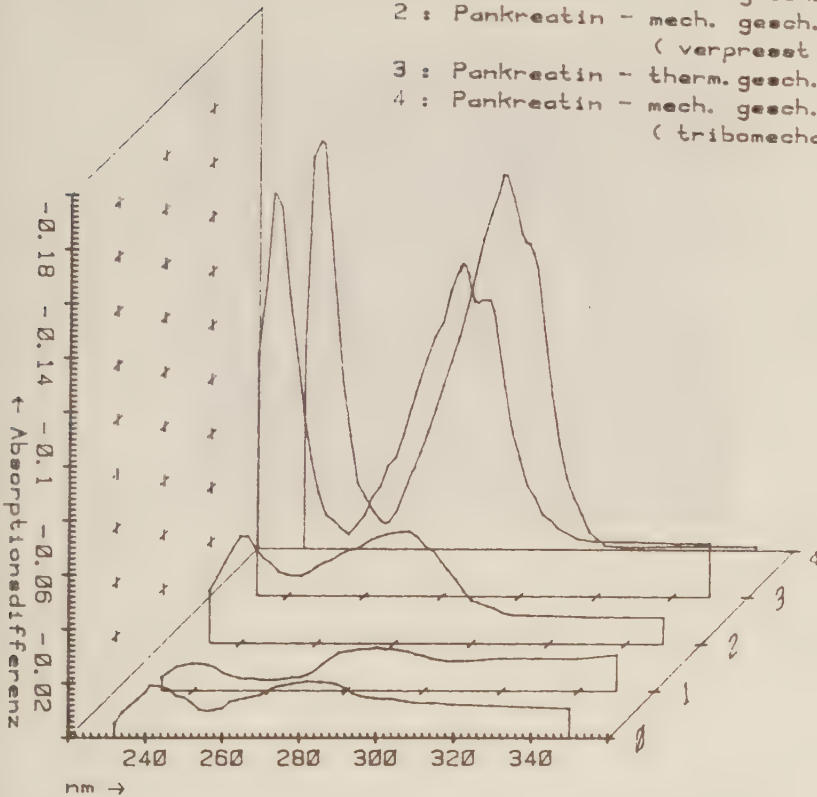


Abb. 81 Differenzspektren von unterschiedlich behandeltem Pankreatin. (Näheres siehe Text).

Abbildung 81 zeigt die Differenzspektren der nach 5.2.1. erhaltenen Proteinlösung von mechanisch oder thermisch geschädigtem Pankreatin. Es ergeben sich deutliche Unterschiede, die als weiterer Beweis dafür anzusehen sind, daß es bei mechanischer Enzyminaktivierung z.B. bei Mahlung oder Verpressung zu strukturellen Veränderungen kommt. Das gleiche gilt für thermisch geschädigtes Pankreatin.

6. Kleine Komprimat

6.1. Quasiisostatische Komprimierung

Verpreßt man ein Proteingemisch wie Pankreatin auf herkömmlichen Tablettenmaschinen, so resultiert eine mit strukturellen Veränderungen einhergehende Denaturierung. Das "weiche" Pankreatin wird zwischen den "harten" Preßwerkzeugen verformt; die Verdichtung des Tablettiergutes verläuft dabei so, daß verschiedene Zonen des Preßkörpers unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt werden (6/49/59/60).

1982 wurde von der Firma NUKEM ein neuartiges Kompressionsprinzip zur Herstellung relativ kleiner Komprimat vorgestellt. Wenngleich diese Entwicklung auf die Verarbeitung von Kernbrennelementen gerichtet war, erschien es sinnvoll, experimentell zu überprüfen, inwieweit diese neue Methode für die Verpressung des hier vorliegenden empfindlichen Materials geeignet ist.

6.1.1. Prinzip dieses Kompaktierverfahrens

Die Materialverdichtung erfolgt auf hydraulischen Pressen. Hierzu kann entweder eine EINSTÄNDERPRESSE oder die von NUKEM entwickelte MIKROTABLETTENPRESSE MTP 1000 eingesetzt werden.

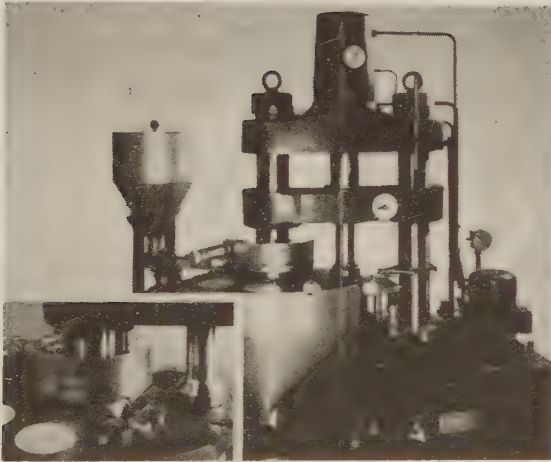


Abb. 82 Mikrotablettenpresse MTP 1000 (NUKEM)

Die zu kompaktierenden Schüttgüter werden im Regelfall ohne aufwendige Vorbereitung und ohne den Zusatz von Tablettierhilfsstoffen in die Vertiefung einer GUMMIELASTISCHEN FORM gebracht und zusammen mit dieser Form bei Drücken von 10 bis 300 MPa verdichtet. Die Verpressung in den Formen erfolgt QUASISTATISCH, d.h. der Druck wirkt nicht in einer bevorzugten Richtung, sondern von allen Seiten weitgehend gleichmäßig ein. Dadurch wird das Volumen von Platte, Einzelmatrix und Preßgut druckabhängig verringert. Nach dem Pressen nimmt die Form ihre ursprüngliche Abmessung wieder an; die verdichteten Tabletten liegen in der Vertiefung und werden durch Umdrehen der Form bei leichtem Schütteln entnommen (Abbildung 83).

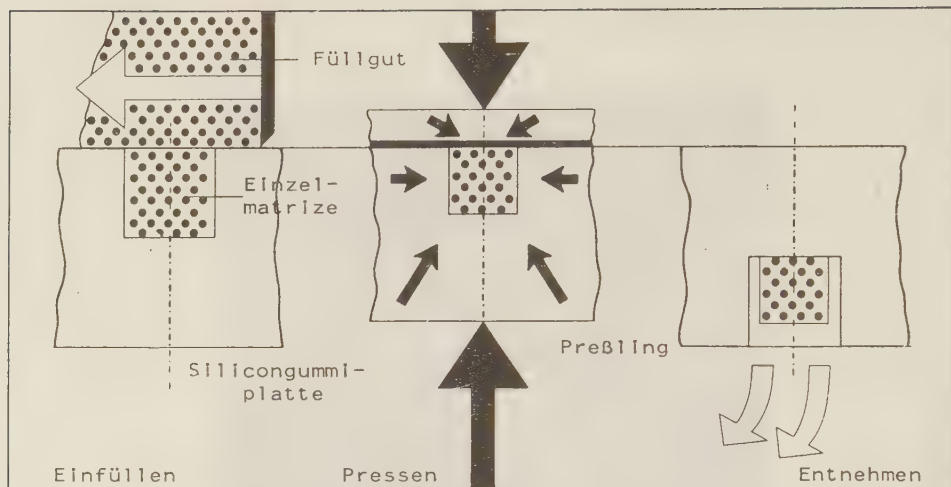


Abb. 83 Prinzip der Verpressung von Pulvern in einer gummielastischen Form (120).

Die mit zahlreichen zylindrischen Vertiefungen versehenen Gummimatrizen bestehen aus Siliconkautschuk und haben bei einer Dicke von 15 mm einen Durchmesser von 130 mm. Je nach Lochdurchmesser (1,5 bis 8,0 mm) ändert sich die Anzahl der Vertiefungen; bei einem Lochdurchmesser von 1,5 mm hat jede Platte 3000 Vertiefungen, bei einem Durchmesser von 8,0 mm 100 (120).

Gegenüber den bekannten Verfahren zur Tablettenherstellung schien dieses Kompaktierungsprinzip für Pankreatin einige Vorteile aufzuweisen*:

* Der Firma NUKEM, Hanau, danke ich für die Möglichkeit Pankreatin quasistatistisch zu verpressen und für die großzügige Unterstützung der Versuchsarbeiten.

- Das "Tablettieren" erfordert keine Bindemittel und keine Pulvervorbereitung.
- Es sind Tablettendurchmesser von ca. 6 mm bis hinunter zu ca. 1 mm möglich.
- Die Verformung erfolgt quasiisostatisch.
- Das "weiche" Pankreatin kann der ebenfalls weichen Gummiform einen andersgearteten Widerstand entgegensetzen.

Nur das Experiment konnte zeigen, ob eine Verpressung in Gummiformen die diskutierten Vorteile besitzt.

6.1.2. Versuchsdurchführung

Pankreatin wurde ohne Hilfsstoffe und vergleichsweise mit den Zusätzen Methocel[®] E5 (5 %) und Ac-Di-Sol[®] (5 %) in verschiedenen Gummiformen (1,5/3000; 4,0/440 und 8,0/100) auf einer hydraulischen Einständerpresse - Eigenkonstruktion der Firma NUKEM - mit Preßdrücken von 30, 50, 80 und 200 MPa kompaktiert.

Bis zur Erreichung des jeweiligen Maximaldruckes waren 12 s erforderlich.

Trockengranulat N konnte auf der automatischen MTP 1000 (NUKEM), die nach dem gleichen Prinzip arbeitet, verpreßt werden. Abbildung 84 zeigt die eingesetzten Preßformen und die bei der Kompaktierung von Pankreatin resultierenden Preßlinge.

Nach der Verpressung wurden

- Amylaseaktivität
- Lipaseaktivität
- scheinbare Dichte
- Verfärbung und
- Tablettenkennzahlen

bestimmt (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11 Tablettenkennzahlen der bei quasistatischer Verpressung mit Silicongummimatrizen erhaltenen Komprimat.

Preßdruck	Amylaseaktivität FIP-E/mg (% Verlust)	Lipaseaktivität FIP-E/mg (% Verlust)	Verfärbung Integratoreinheiten $\times 10^4$	Scheinbare Dichte (g/cm ³)	$\bar{x}$ (mg)	s_{rel} (%)	Bruch- festig- keit N	Friabilität (%)	Zerfallszeit H ₂ O 310 K (min)
(1,5 / 3000) ¹⁾									
30 MPa	29,1 (3,0 %)		171,5	0,89	0,68	16,2		1,0	3)
50 MPa	29,1 (3,0 %)	29,2 (10,2 %)	195,5	0,91	0,69	13,0		0,0	3)
80 MPa	28,0 (6,7 %)		226,8	0,95	0,69	14,5		0,0	25)
200 MPa	25,2 (16,0 %)	24,5 (24,6 %)	263,4	1,24	0,68	16,2		0,1	28)
(4,0 / 440) ¹⁾									
30 MPa	30,2 (+ 0,7 %)		139,2	0,78	7,8	8,7	6	0,9	15)
50 MPa	29,5 (1,7 %)	27,7 (14,7 %)	164,9	0,89	8,3	7,6	20	0,4	14)
80 MPa	27,9 (7,0 %)		197,1	0,93	7,7	10,8	32	0,2	15)
200 MPa	26,9 (10,3 %)	26,4 (18,8 %)	265,2	1,09	8,2	5,5	40	0,0	15)
(8,0 / 100) ¹⁾									
30 MPa	29,4 (2,0 %)		142,8	0,80	84,0	8,3	53	1,8	27)
50 MPa	30,1 (+ 0,3 %)	28,6 (12,0 %)	168,4	0,84	82,0	4,9	88	0,5	32)
80 MPa	28,4 (5,3 %)		206,0	0,88	80,0	5,0	137	0,2	33)
200 MPa	27,0 (10,0 %)	27,8 (14,5 %)	276,5	1,02	80,0	3,8	130	0,0	33)
(8,0 / 100) ²⁾									
27 MPa	28,6 (0,0 %)		201,2		155,0	3,9	6	44,0	50)
50 MPa	28,3 (1,0 %)		196,6		162,0	6,2	8	14,5	53)
75 MPa	29,3 (+ 2,5 %)		205,8		164,0	6,7	15	2,9	55)
90 MPa	27,8 (2,8 %)		183,4		161,0	5,0	18	1,7	55)
Pankreatin	30,0	32,5	111,0						
Trockengranulat N	28,6		196,1						

1) Die Versuche wurden mit Pankreatin durchgeführt. 2) Diese Versuche wurden mit Trockengranulat N durchgeführt. 3) Paddle-Apparatur. 4) ERWEKA-Apparatur mit Pellet-Einsatz. 5) ERWEKA-Apparatur.

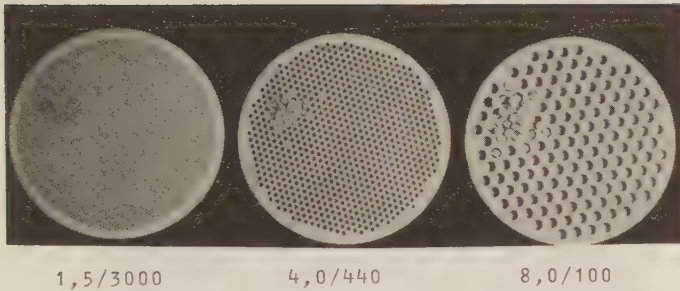


Abb. 84 Die bei der NUKEM-Methode verwendeten Silicongummiformen und die resultierenden Preßlinge.

6.1.3. Ergebnisse

Die Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Der Preßkörper

- Je nach Gummiform resultieren bei der Kompaktierung von REINEM PANKREATIN mit einer Preßkraft von 50 MPa Preßlinge mit folgendem Durchmesser:

Vertiefungsdurchmesser		Komprimatdurchmesser	
1,5 mm	→	1,0 mm	
4,0 mm	→	2,8 mm	
8,0 mm	→	5,5 mm	

Die größeren Tabletten haben eine konkave, ungleichmäßige Gestalt, die Oberfläche ist rauh.

Für die Beurteilung der Gefügeveränderung und des bio-pharmazeutisch relevanten Zerfalls mußten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 85 und 86 dargestellt.

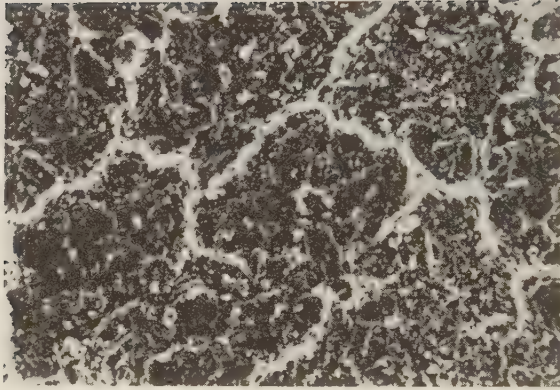


Abb. 85 Oberfläche einer nach der NUKEM-Methode hergestellten Pankreatintablette; Gummi-form 4,0/440, Preßdruck 30 MPa.

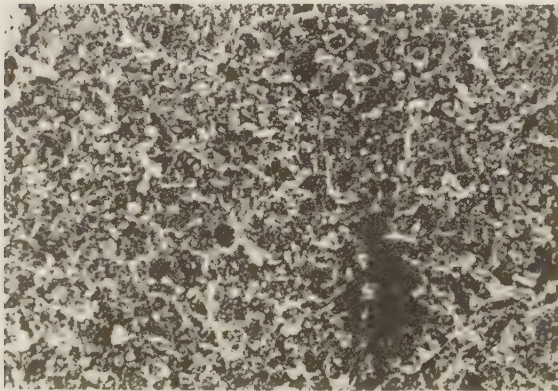


Abb. 86 Oberfläche einer unter gleichen Bedingungen, aber mit 200 MPa hergestellten Tablette.

Bei einem niedrigen Preßdruck von 30 MPa sind noch verformte Pankreatinpulverteilchen zu erkennen, ohne daß es zu einer Fusion gekommen ist. Eine mit erhöhtem Preßdruck von 200 MPa hergestellte Tablette läßt die Strukturelemente des Ausgangspulvers deutlicher erkennen, als die auf einer Rundlaufpresse mit einem vergleichbaren Preßdruck hergestellten Tabletten (vgl. Abbildung 55).

- Die hergestellten Komprimata sind unansehnlich, sie entsprechen nicht den Anforderungen an eine pharmazeutische Tablette.
Gegen die Herstellung von einzeldosierten Formkörpern auf diesem Wege spricht auch die hohe Standardabweichung der resultierenden Komprimata.
- Verpreßt man mit 80 bzw. 200 MPa, so erhält man Komprimata, die bei ausreichender mechanischer Festigkeit einen vergleichsweise guten Zerfall von 15 bis 30 Minuten, der allerdings von Tablettengröße und Tablettengewicht abhängig ist, zeigten.
- Ein Zusatz von 5 % Ac-Di-Sol[®] bzw. 5 % Methocel E5 hat keinen meßbaren Einfluß auf die Zerfallszeit (Tabelle 12).
- Bei der Verpressung von TROCKENGRANULAT N auf der automatischen MTP 1000 resultieren Preßlinge mit geringer mechanischer Festigkeit, aber einer hohen Amylaseaktivität von fast 100 %. Aufgrund ihres Aussehens und ihrer galenischen Eigenschaften waren diese Komprimata unbrauchbar. Sie wurden daher bei den nachstehenden Überlegungen nicht berücksichtigt.

2) Enzymaktivitäten der kleinen Komprimata

- Wie aus Abbildung 87 hervorgeht, ist die AMYLASEAKTIVITÄT bei der Verpressung von reinem Pankreatin stark druckabhängig. Überschreitet man einen kritischen Preß-

Kenngrößen der Silikon-
gummiformen

1 : 1,5 / 3000

2 : 4,0 / 440

3 : 8,0 / 100

A : α -Amylaseaktivität

L : Lipaseaktivität

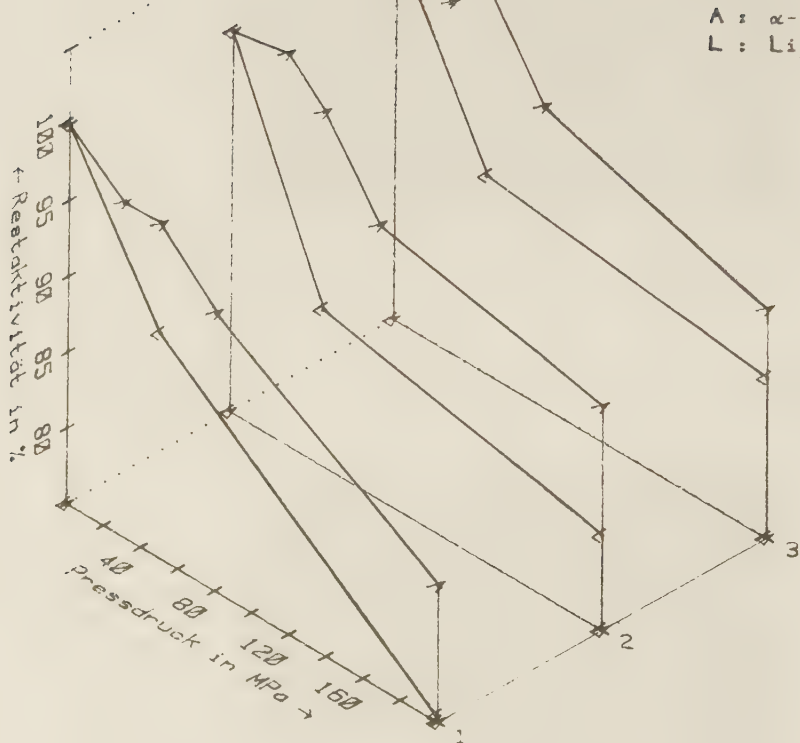


Abb. 87 α -Amylase- und Lipaseaktivität in Abhängigkeit vom Preßdruck bei quasistatischer Verpressung von Pankreatin (Ausgangsaktivität der α -Amylase 30,0 FIP-E/mg und der Lipase 32,5 FIP-E/mg).

druck von 50 MPa^{**}, so resultiert eine Inaktivierung, die nicht nur vom Preßdruck, sondern auch von der Größe der ge-

^{**} 50 MPa entsprechen formal einer Preßkraft von ca. 5 kN auf konventionellen Pressen.

bildeten Komprimat abhängt. Die Verpressung zu sehr kleinen Formen ($\varnothing = 1 \text{ mm}$) erweist sich dabei als ungünstiger als die Herstellung größerer Tabletten ($\varnothing = 2,8 \text{ mm} / \varnothing = 5,5 \text{ mm}$). Analog zu diesen Befunden ist die scheinbare Dichte der kleineren Preßlinge bei gleichem Preßdruck höher. Es besteht, wie systematische Versuche ergaben, unabhängig von der Formgröße, ein linearer Zusammenhang zwischen der scheinbaren Dichte und der Amylaseaktivität (Abbildung 88).

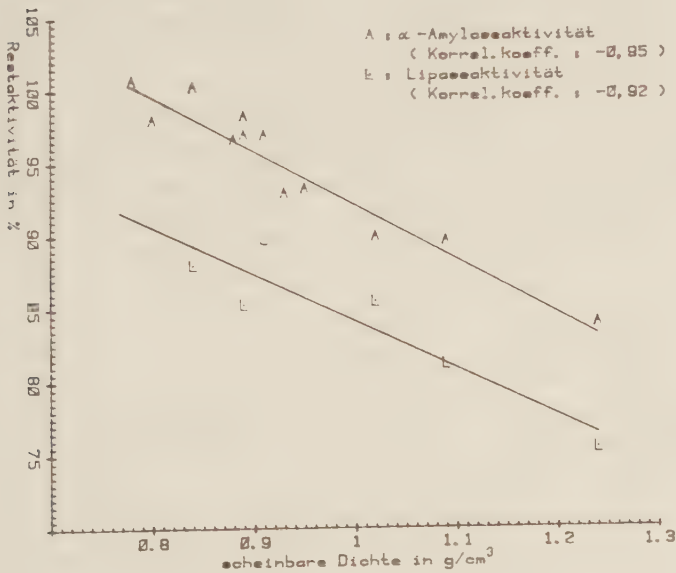


Abb. 88 Scheinbare Dichte und α -Amylase- bzw. Lipaseaktivität bei quasistatistischer Verpressung (Ausgangsaktivität der α -Amylase: 30,0 FIP-E/mg und der Lipase: 32,5 FIP-E/mg).

- Die LIPASE wird stärker inaktiviert als die Amylase;

schon bei einem Preßdruck von 50 MPa zeigt sich ein deutlicher Aktivitätsrückgang um 10 bis 15 Prozent (siehe Abbildung 87). Wie für die Amylase gilt auch für die Lipase, daß die Aktivität um so geringer, je höher die scheinbare Dichte der Preßlinge ist (Abbildung 88). Somit muß für die Lipaseinaktivierung der gleiche Mechanismus wie für die Schädigung der α -Amylase postuliert werden.

- Mit steigendem Preßdruck, d.h. mit fallender Enzymaktivität, nimmt die Verfärbung der Preßlinge zu. Auch in diesem Fall muß es somit zu einem Zusammenwirken von Preßdruck und Preßtemperatur kommen (siehe 3.2.3.).
- Setzt man potentiell zerfallsfördernde Hilfsstoffe wie Ac-Di-Sol[®] oder Methocel[®] E5 (je 5 %) zu und verpreßt in 4,0/440 Gummimatrizen, so ergibt sich eine geringfügige Verbesserung der Amylaseaktivitäten; dementsprechend ist auch die scheinbare Dichte niedriger (Abbildung 89 und Tabelle 12).

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Die Herstellung von kleinen Komprimaten in Silicongummimatrizen mit den Kenngrößen 1,5/3000, 4,0/440 und einem Preßdruck von 50 MPa erweist sich als günstig. Die spezielle Preßtechnik erlaubt in diesem Fall reines Pankreatin ohne Hilfsstoffzusatz einzusetzen. Die Preßlinge haben bei ausreichender mechanischer Festigkeit gute Zerfallseigenschaften; die Aktivität der Lipase nimmt um 10 bis 15 Prozent, die der α -Amylase nur geringfügig (< 3 %) ab.

Tabelle 12 Verpressung von Pankreatin mit Hilfsstoffen nach der NUKEM-Methode (Kennzahlen der Silikongummatrizen (4,0/440)).

	Amylaseaktivität (FIP-E/mg)	scheinb. Dichte (g/cm ³)	$\bar{x}$ (mg)	S _{rel} (%)	Bruchfestigkeit (N)	Friabilität (%)	Zerfall: H ₂ O/310 K (min)
ankreatin	30,0	0 %					
50 MPa	29,5 (-1,7 %)	0,89	8,3	7,6	20	0,4	14
80 MPa	27,9 (-7,0 %)	0,93	7,7	10,8	32	0,2	15
200 MPa	26,9 (-10,3 %)	1,09	8,2	5,5	40	0,0	15
ankreatin + % Methocel® E5	28,3	0 %					
50 MPa	28,5 (+0,7 %)	0,78	8,1	6,8	6	0,4	15
80 MPa	27,2 (-3,9 %)	0,81	7,6	8,1	17	0,0	15
200 MPa	25,8 (-8,8 %)	1,00	8,3	5,7	27	0,2	18
ankreatin + % Ac-Di-Sol	28,0						
50 MPa	28,0 (0,0 %)	0,83	7,8	7,7	7	0,3	15
80 MPa	26,6 (-5,3 %)	0,91	7,9	6,3	18	0,0	17
200 MPa	25,4 (-9,3 %)	1,00	8,0	6,3	29	0,2	17

* ERWEKA-Zerfallstester mit Pellet-Einsatz (55 Hub/min)

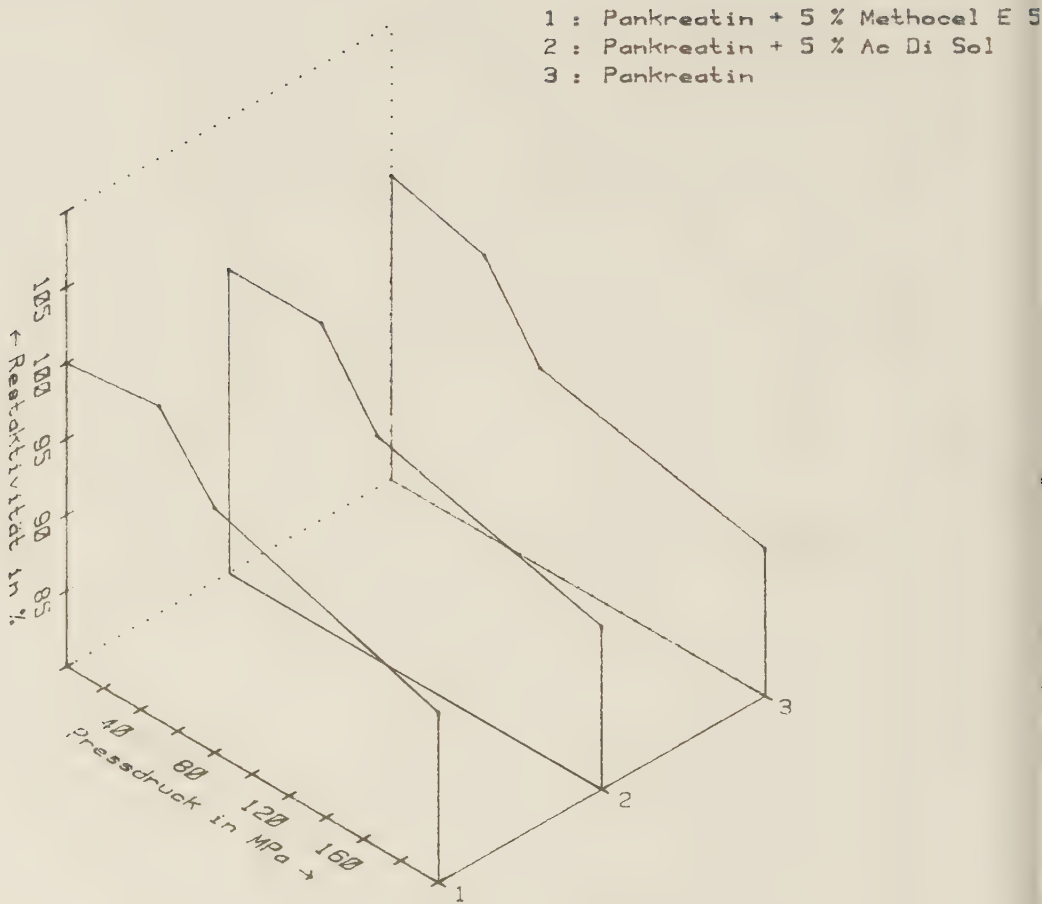


Abb. 89 α -Amylaseaktivität in Abhängigkeit vom Preßdruck bei quasistatischer Verpressung von Pankreatin und Pankreatin-Hilfsstoffmischungen auf 4,0/440 Gummimatrizen (Ausgangsaktivität 30,0 FIP-E/mg).

6.2. Herstellung kleiner Komprimate auf einer Exzenterpresse

Nach der NUKEM-Methode konnten also Pankreatin-Komprimate mit durchaus zufriedenstellenden galenischen Eigenschaften hergestellt werden. Da die Produktionsleistung des beschriebenen Verfahrens allerdings gering ist, blieb zu klären, ob auf herkömmlichen Tablettenmaschinen, wie z.B. einer Exzenterpresse, kleine Komprimate mit ähnlich guten Eigenschaften gewonnen werden können. Dazu wurde auf einer EXZENTERPRESSE (Exakta 1) Pankreatin mit kleinen Preßwerkzeugen - oblong, flach 4 x 6 mm und $\varnothing$ 6 mm rund mit Facette - mit 3 Hub/min und verschiedenen Preßkräften zu 40 bzw. 80 mg Tabletten verpreßt. Es resultierten die in Tabelle 13 wiedergegebenen Tablettenkennzahlen.

Die nach diesem Preßverfahren gewonnenen Aktivitäten sind deutlich niedriger; vergleicht man jedoch die Komprimate mit gleicher scheinbarer Dichte, so ergeben sich kaum Unterschiede in Bezug auf die Amylase- und Lipaseinaktivierung. Auch Bruchfestigkeit und Zerfallszeit entsprechender Komprimate unterscheiden sich praktisch nicht.

Bei der NUKEM-Methode mußten zur Herstellung der entsprechenden Preßlinge wesentlich höhere Preßdrücke aufgebracht werden; der effektive, auf das Tablettiergut einwirkende Preßdruck muß, wie der Vergleich zeigt, aber wesentlich geringer sein. Hierfür gibt es zwei Erklärungen:

- Die auf das Preßgut von allen Seiten einwirkenden Preßdrücke heben sich in ihrer Wirkung auf, oder
- ein Teil des Preßdrucks wird von der Gummimatrizie aufgenommen.

Tabelle 13 Tablettenkennzahlen der auf einer Exzenterpresse (Exakta 1) hergestellten kleinen Komprimat

Preßkraft (kN)	α -Amylase- aktivität (FIP-E/mg)	Lipase- aktivität (FIP-E/mg)	scheinb. Dichte (g/cm ³)	$\bar{x}$ (mg)	s_{rel} (%)	Bruchfestig- keit (N)	Friabilität (%)	^{3) Zerfall} H ₂ O/310 K (min)
0,1	29,2 (-1,4%)		0,61	39,2	1,1	8	8,7	13
0,2	29,5 (-0,3%)	28,6 (-12%)	0,73	41,0	3,9	10	0,9	18
0,4	27,3 (-7,8%)		0,92	40,6	3,7	75	0,2	17
1,0	27,0 (-8,8%)		1,07	39,6	3,4	130	0,0	21
2,4	24,8 (-16,2%)	22,9 (-29,5%)	1,23	39,0	1,8	140	0,0	20
4,5	24,6 (-16,9%)	23,3 (-28,3%)	1,31	41,4	5,3	150	0,0	25
7,5	23,2 (-21,6%)		1,29	38,6	4,3	135	0,0	25
2)								
0,1	29,1 (-1,7%)		0,63	78,4	3,9	6	10,3	25
0,5	27,3 (-7,8%)		0,91	80,0	3,4	30	1,6	30
2,0	25,5 (-13,9%)		1,18	78,1	3,3	95	0,1	27
5,0	25,7 (-13,2%)		1,19	76,8	3,1	135	0,0	33
7,5	25,8 (-12,8%)		1,15	81,7	4,4	110	0,0	26
Ausgangs- substanz	30,0	32,5						

1) oblong 4 x 6 flach / 2) rund $\varnothing$ 6 mm mit Facette / 3) ERWEKA-Zerfallstester (55 Hub/min)

6.3. Zusammenfassung

Die mit Gummimatrizen hergestellten Komprimata sind als niedrig dosierte Pankreatinpräparate für eine Einzeldosierung ungeeignet. Im Vergleich zu Exzenter-gepreßten erfüllen die Komprimata die Anforderungen bezüglich Tablettenaussehen nicht.

Zur Kompaktierung, d.h. zur Trockengranulation von Pankreatin ist das Verfahren allerdings gut geeignet. Insbesondere die Gummiformen mit einem Durchmesser der Vertiefungen von 1,5 und 4,0 mm eignen sich hierzu. Verpreßt man Pankreatin in solchen Formen mit 50 MPa, so erhält man Kompaktlinge mit einem Durchmesser von 1 bzw. 2,8 mm und einer Höhe von 0,8 bzw. 1,4 mm. Derartige Formkörper können auf herkömmlichen Tablettenmaschinen praktisch nicht hergestellt werden.

Das mit der NUKEM-Methode erhaltene "Granulat" ist einheitlich, galenisch gut weiterzuverarbeiten und zeigt bei einer ausreichenden mechanischen Festigkeit verhältnismäßig geringe α -Amylase- und Lipaseaktivitätsverluste. Die Granulatkörner haben einen ausreichend schnellen Zerfall. Derartige, ohne Hilfsstoffzusatz aus Pulvermaterial hergestellte Komprimata eignen sich, nachdem man sie gegebenenfalls magensaftresistent überzogen hat, zur direkten Einnahme oder zur Abfüllung in Hartgelatinekapeln. Um ein solches Granulat allerdings großtechnisch herzustellen, müßte die Leistung der MTP 1000, die ja noch einen Prototyp darstellt, wesentlich erhöht werden.

6.4. Einfluß der Tablettengröße auf die Enzyminaktivierung

Betrachtet man die Inaktivierung der Amylase in Abhängigkeit von der PRESSKRAFT auf einer EXZENTERPRESSE, so stellt man fest, daß bei vergleichbaren Preßkräften das Ausmaß der Inaktivierung bei unterschiedlich großen Preßlingen relativ stark

differiert: Während bei den großen Komprimaten (12 bis 16 mm) bei ca. 6 kN nur unwesentliche Verluste auftraten, betragen die vergleichbaren Werte bei kleindimensionierten Formlingen 15 bis 20 Prozent (siehe Abbildung 90).

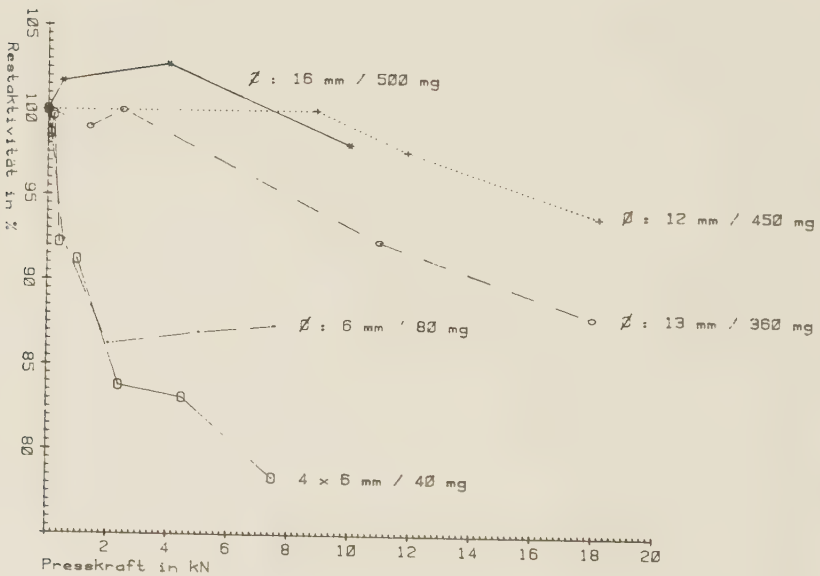


Abb. 90 α -Amylaseaktivität in Abhängigkeit von der Preßkraft.

Zur Erklärung dieses Sachverhaltes kann folgende Überlegung angestellt werden:

Wirkt eine definierte Preßkraft auf eine kleinere Fläche, so resultiert ein höherer Druck.

Trägt man nun die Amylaseaktivität gegen den resultierenden PRESSDRUCK auf (Abbildung 91), so beobachtet man auch bei den größeren Formkörpern deutliche Aktivitätsverluste, sofern Werte von ca. 150 MPa erreicht werden (Abbildung 91).

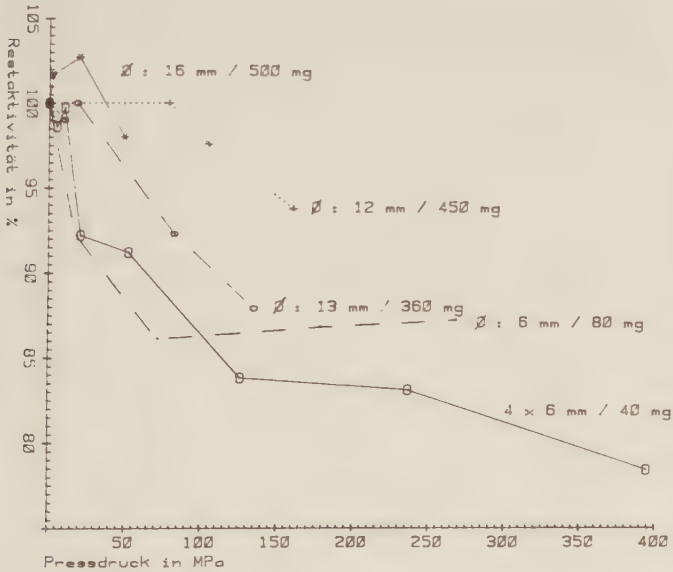


Abb. 91 α -Amylaseaktivität in Abhängigkeit vom Preßdruck.

Berücksichtigt man auch das GEWICHT der hergestellten Komprimierte und bildet den Quotienten für den EFFEKTIVEN PRESSDRUCK, so ergibt sich:

$$P_e = \frac{F}{A \cdot \bar{x}}$$

Gl. 14

mit P_e = effektiver Preßdruck
 F = Preßkraft
 A = Fläche, auf die die Preßkraft F einwirkt
 $\bar{x}$ = Masse der Tablette

Trägt man die Werte für Enzymaktivität und scheinbare Dichte über P_e auf, so erhält man hyperbolische Kurvenverläufe, gemäß Abbildung 92.

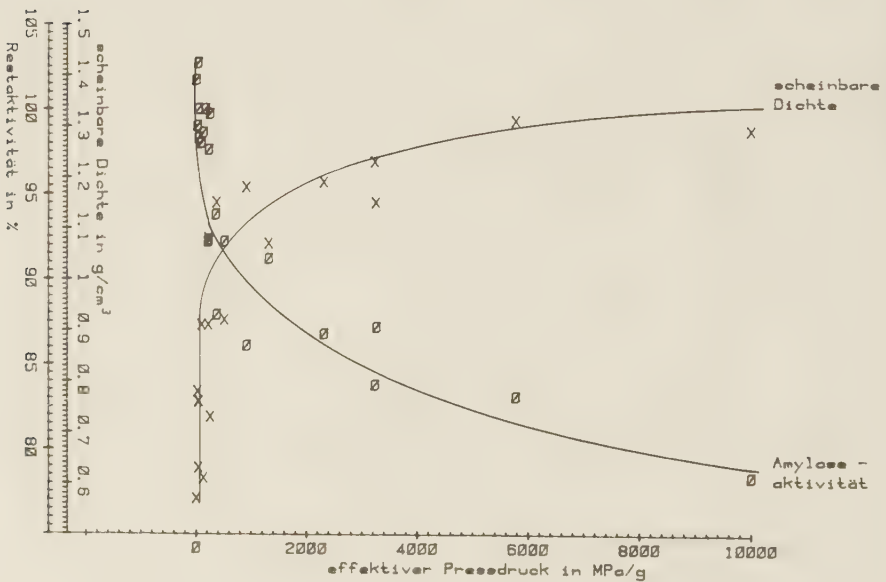


Abb. 92 α -Amylaseaktivität und scheinbare Dichte in Abhängigkeit von dem effektiven Preßdruck P_e .

Trägt man nun den Enzymaktivitätsverlust gegen die scheinbare Dichte der Komprimierte auf, so erhält man eine lineare Beziehung.

(Abbildung 93), d.h. bei dieser Betrachtungsweise wirken sich die geometrischen Parameter nicht aus.

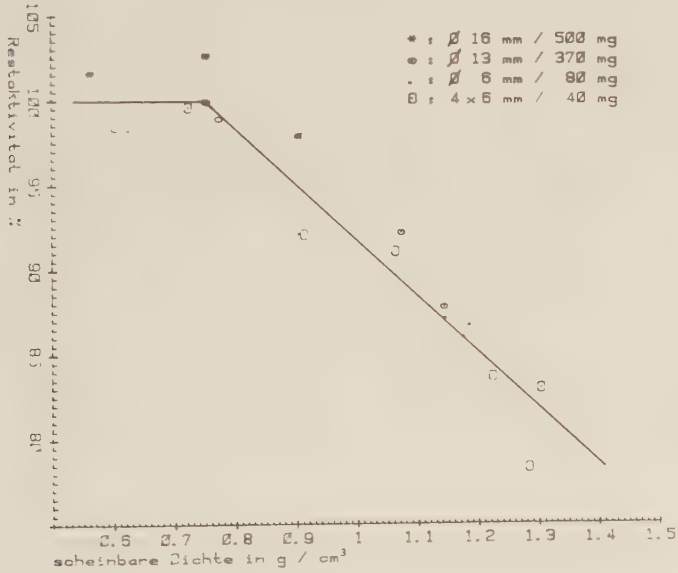


Abb. 93 α -Amylaseaktivität in Abhängigkeit von der scheinbaren Dichte (ρ_{sch}).

7. Mikrobiologische Aspekte

Angesichts der Gewinnung von Pankreatin aus Bauchspeicheldrüsen von Schweinen und Rindern besteht grundsätzlich die Gefahr einer starken Kontamination mit Fäkalkeimen. Daher werden bei der Herstellung keimreduzierende Maßnahmen diskutiert. Derartige Maßnahmen, wie z.B. die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, Isopropanol und Gammastrahlen (38) bzw. Äthylenoxid (39) können nicht nur zu einer Keimzahlreduzierung, sondern auch zu einer Enzyminaktivierung führen. Daher werden sie vermieden und es ist nicht verwunderlich, daß in Handelsprodukten bis zu 10^6 KBE/g, zum Teil sogar Salmonellen gefunden werden (10/11/12).

In den hier untersuchten Pankreatinproben wurden nach der KOCH'schen Plattengußmethode $10^2 - 10^4$ KBE/g gefunden. Diese Werte befinden sich nach einem Vorschlag der Ph.Eur.-Kommission* von 1975 an der oberen tolerierbaren Grenze.

Um zu verhindern, daß bei der Lagerung von Rohstoff und galeischen Pankreatinzubereitungen z.B. durch lokale Kondensationsvorgänge eine Keimzahlvermehrung auftritt, sollte es Ziel weiterer Untersuchungen sein, ein Konservierungsmittel zu finden, das bei guter keimhemmender Wirkung nur eine geringe Enzyminaktivierung zur Folge hat.

* Für das kommende Europäische Arzneibuch existiert ein Entwurf zur Keimzahl-limitierung. Dieser sieht für die Kategorie III, d.h. für Oralia, folgende Beschränkungen vor:

10^4 Bakt./g oder ml

100 Pilze oder Hefen, frei von Escherichia coli sowie bei Produkten tierischer Herkunft von Salmonellen in 1 g (121). Anforderung an flüssige Oralia entsprechend Kategorie II.

Da in unserem Arbeitskreis die keimreduzierende Wirkung von ÄTHERISCHEN ÖLEN und TERPENEN von LOMMER (13) für Liquida und von POHLER (14) für tensidhaltige Gele untersucht wurde, sollten Vertreter dieser Substanzklasse auf ihre potentielle Wirkung als Konservierungsmittel für Pankreatin geprüft werden.

7.1. Screeningversuch zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung ätherischer Öle und Terpene

7.1.1. Verfahren

In einem Screening mußten orientierende Kenntnisse über die antimikrobielle Wirkung pharmazeutisch gebräuchlicher Geruchsstoffe gewonnen werden. Obwohl ätherische Öle ihre Hauptwirkung in der Dampfphase entfalten (122/123/124), sollte auch deren antimikrobielle Wirkung in der Flüssigkeitsphase untersucht werden (126/125).

- Die Wirkung ätherischer Öle in der DAMPFPHASE wurde nach einer bei KELLER und KOBER (122) beschriebenen Methode geprüft:

Auf CSP*- bzw. Sabouraud-Agar Platten wurde ein Tropfen einer Bakterien- bzw. Pilzsporensuspension gegeben und mit einer Triangel ausgestrichen. In den Deckel der Petrischale wurde ein Filterpapier gelegt, das mit jeweils 2 Tropfen eines ätherischen Öles getränkt war. Um zu verhindern, daß ätherische Öle aus den Petrischalen durch Verdampfen im Brutschrank entweichen und benachbarte Proben beeinflussen, wurden die einzelnen Platten in Polyäthylenfolien eingeschweißt. Danach wurden sie 24 Stunden für Bakterien (310 K/37 °C) und 6 Tage für Pilze (298 K/25 °C) bebrütet. Wachstum und Hemmung wurden anschließend visuell beurteilt.

*: Caseinpepton-Soja-Pepton

- Um die keimhemmende Wirkung der Geruchsstoffe in der FLÜSSIGKEITSPHASE zu bestimmen, wurde eine bei SCHÜRMANN und KÜHLWEIN beschriebene Methode geringfügig verändert (125). Unter den gewählten Bedingungen war es möglich, die Wirkung der ätherischen Öle in der Dampfphase vollkommen auszuschließen. Im einzelnen gestaltete sich die Untersuchung wie folgt:

Nach dem Erkalten des CSP-bzw. Sabouraud-Agars wurde in die Unterseite der Polystyrol-Petrischale mit einem in der Bunsenbrennerflamme erhitzten, sterilen 1 cm-Korkbohrer ein Loch gestanzt. Auf die Unterseite des Agars konnte nun ätherisches Öl appliziert werden. Die Dosis betrug 15 μ l bzw. 15 mg bei Feststoffen, wie z.B. Vanillin. Nach der Applikation wurde die Öffnung mittels eines Tesafilms verschlossen (siehe Abbildung 94).

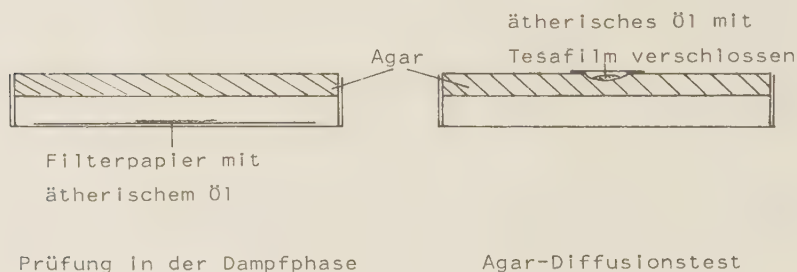
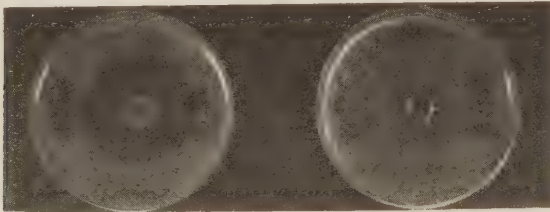


Abb. 94 Applikationsart zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung ätherischer Öle.

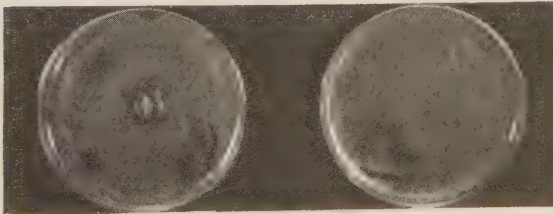
Um die Schichtdicke des Agars konstant zu halten, wurde jede Platte mit ca. 17 ml Agar ausgegossen, dies entspricht etwa einer Höhe von 4 mm. War das ätherische Öl appliziert, wurden die Platten 24 Stunden bei Raumtemperatur unter

aseptischen Bedingungen aufbewahrt, so daß der Geruchsstoff in den Agar diffundieren konnte. Danach beimpfte man die Oberseite des Agars mit den entsprechenden Keimsuspensionen und bebrütete 24 Stunden für Bakterien (310 K/37 °C) und 6 Tage für Pilze (298 K/25 °C). Die Hemmhofgrößen wurden planimetrisch bestimmt.



Zimtaldehyd 15 µl

Zimtalkohol 15 µl



Zimtsäure ca. 15 mg

Leerwert

Abb. 95 Hemmhofbildung unter den genannten Versuchsbedingungen.

7.1.2. Resultate des Screenings

Die Geruchsstoffe wurden auf ihre antimikrobielle Wirkung gegenüber folgenden Mikroorganismen untersucht:

1) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	gramnegativ
2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	gramnegativ
3) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	grampositiv
4) <i>Micrococcus</i> spezies	grampositiv
5) <i>Bacillus</i> spezies	grampositiv
6) <i>Penicillium</i> spezies MERCK M 2510	Ascomyceten
7) <i>Alternaria</i> spezies	Ascomyceten

Die Keime 4, 5 und 7 wurden aus Pankreatin isoliert*. Es handelt sich um ubiquitär auftretende Umweltkeime. Obwohl sie nicht pathogen sind, keine Toxinbildner darstellen und keine Verderbnis auslösenden Mikroorganismen sind, ist ihre Anwesenheit in pharmazeutischen Zubereitungen unerwünscht.

Tabelle 14 zeigt die erhaltenen Resultate.

Die Untersuchungen lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- Geruchsstoffe, die ihre Hauptwirkung in der DAMPFPHASE entfalten, sind Citral, Öl. *Menthae pip.*, Linalool, α -Terpineol und Geraniol.
- Allein im AGAR-DIFFUSIONSTEST, d.h. in der Flüssigkeitsphase, wirken Zimtsäure, Zimtalkohol und Vanillin. Dies läßt sich mit dem geringen Dampfdruck dieser bei Zimmertemperatur festen Substanzen erklären.
- Die Wirksamkeit der Geruchsstoffe gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ist geringer. Nur Anisaldehyd, Zimtalkohol, Zimtsäure, Zimtaldehyd, Vanillin und "Allylsenfö" zeigen Wirkung.
- Die antimikrobielle Potenz der ätherischen Öle gegenüber Pilzen ist gut.

* Herrn Dr. Grigo (Firma E. Merck, Darmstadt) sei für die Identifizierung der isolierten Mikroorganismen gedankt.

Tabelle 14 Prüfung ätherischer Öle auf antimikrobielle Wirkung in der Dampf- (Spalte 1) und Flüssigkeitsphase (Spalte 2).

Verwendetes ätherisches Öl	E. coli	Staph. aureus	P. aeruginosa	Micrococcus sp.	Bacillus sp.	Penicillium sp.	Alternaria sp.
Fenchöl rekt.	+	-	-	+	-	+	+++
Fenchon	++	-	-	+	-	-	+++
Nelkenöl	++	+	+	+	++	+++	+++
Eugenol	++	+++	-	++	++	+++	+++
Anisöl	-	-	-	+	-	+	+++
Estragol	-	-	-	-	-	-	++
Anisaldehyd	-	+	-	+	+	+++	+++
Kümmelöl	+	-	+	-	-	+++	+++
Carvon	+	++	+	+++	++	+++	+++
Nachholderbeeröl	-	-	-	-	-	-	-
Pfefferminzöl	-	+++	+	+++	+++	+++	+++
Menthon	+	-	-	-	-	-	++
Menthon	-	-	-	+	+	+++	+++
Menthofuran	+	-	-	-	-	-	+
1-Menthylacetat	-	-	-	-	-	-	+
Terpinolen	-	-	+	+	-	++	++
Linalool	++	++	-	++	+++	+++	++
Methylacetat links	-	-	-	-	-	-	+

- keine Wirkung (Wachstum) + geringe Wirkung ++ gute Wirkung +++ sehr gute Wirkung
(geringes Wachstum)

Fortsetzung Tabelle 14

	E.coli	Staph.aureus	P.aeruginosa	Micrococcus sp.	Bacillus sp.	Penicillium sp.	Alternaria sp.
Orangenessenz	-	-	-	-	-	-	++
Zitronenöl	-	-	-	-	-	-	++
Citral	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++
Citronellol	-	+	-	+++	+++	+++	+++
Citronellal	-	+++	-	+++	+++	+++	+++
Zimtöl (Rinde)	+	-	-	-	-	+++	+++
Zimtsäure	-	++	-	+	+++	-	+++
Zimtaldehyd	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Zimtalkohol	-	+++	-	+	+++	+++	+++
Orthomethoxyzimtsäure	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	+	++	-	+++	+++	+++	+++
Vanillin	-	+++	-	+++	-	+++	-
α -Terpineol	+++	++	-	++	+++	+++	+++
Farnesol	-	-	-	+	+++	-	-
Borneol	-	++	-	+++	+++	+	+++
Bornylacetat	-	-	-	+	+	+	-
Allylsenfö	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- keine Wirkung (Wachstum) + geringe Wirkung ++ gute Wirkung +++ sehr gute Wirkung
(geringes Wachstum)

- Die aus Pankreatin isolierten Mikroorganismen sind empfindlicher als die gewählten Testkeime.
- Die am sichersten wirkenden Geruchsstoffe sind Zimtaldehyd und "Allylsenöl".
- Wenngleich Aldehyde prinzipiell günstige Wirkungen zeigen, fällt bei Zimtsäure, Zimtalkohol, Linalool und Eugenol, also Alkoholen und Säuren, im Rahmen der beschriebenen Versuchsanordnung eine signifikante Wachstumshemmung auf.

Nach den Ergebnissen des Screenings wurden für weitere Untersuchungen folgende Geruchsstoffe ausgewählt:

- Oleum Caryophylli
- Eugenol
- Zimtalkohol
- Zimtaldehyd
- Zimtsäure
- Vanillin
- Oleum Menthae pip.
- Geraniol
- Citral

7.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

7.2.1. Methode

Die MHK der oben genannten ätherischen Öle wurde nach WALL-HÄUSSER (127) im Reihenverdünnungstest bestimmt:

Unter Verwendung einer gesättigten Geruchsstofflösung anstelle von H_2O wurde CSP-Bouillon hergestellt und diese jeweils 1:1 mit normaler Bouillon weiter verdünnt. Original und Verdünnung wurden mit ca. 10^5 KBE/ml beimpft.

Als Testkeim wurden *Bacillus* sp. und *E. coli* verwendet (siehe schematische Darstellung Abbildung 96).

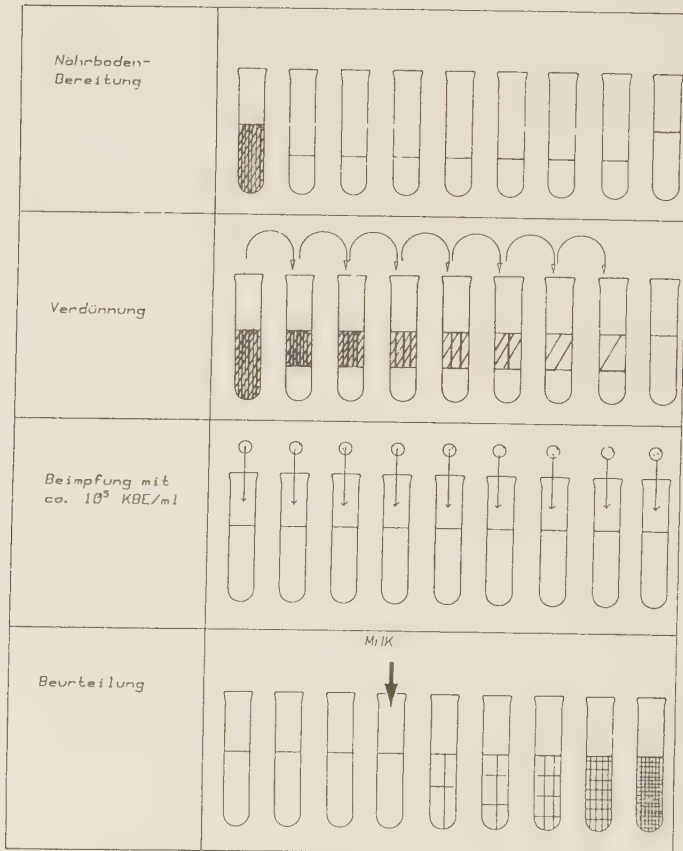


Abb. 96 Reihenverdünnungstest (13)

7.2.2. Ergebnisse

Tabelle 15 zeigt die erhaltenen Werte für die MHK bei Verwendung von bei Raumtemperatur gesättigten Geruchsstofflösungen. Als Grad für die Wirksamkeit des jeweiligen ätherischen Öls ist diejenige Verdünnung angegeben, bei der gerade kein Wachstum auftrat, was bekanntlich durch die MHK gekennzeichnet wird.

Die Resultate stimmen sehr gut mit den beim Agar-Diffusionstest erhaltenen Ergebnissen überein. Es zeigt sich also, daß jener Test für die Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit ätherischer Öle in der Flüssigkeitsphase gut geeignet ist.

Citral besitzt gegenüber *E. coli* keine Wirkung, was nach Untersuchungen von LOMMER (13) darauf zurückzuführen ist, daß die Löslichkeit in Wasser zu gering ist. Nur durch Einsatz von Tensiden (Polysorbat) wurde eine bemerkenswert gute antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen. Eine weitere Ausnahme stellt unter den gewählten Versuchsbedingungen die Zimtsäure dar, deren Unwirksamkeit auch auf die Schwerlöslichkeit der freien Säure zurückgeführt werden kann. Durch Anhebung des pH-Wertes auf ca. 7 kann zwar die Löslichkeit verbessert werden, ohne daß eine Diffusion durch die Zellmembran stattfindet. Dissoziierte Verbindungen sind bekanntlich nicht in der Lage, in die Zellen einzudringen, was auch in Übereinstimmung mit der Tatsache steht, daß Konservierungsmittel vom Typ der Sorbinsäure und der Benzoessäure im sauren pH-Bereich wirksam sind.

Tabelle 15 MHK der untersuchten Geruchsstoffe
für *E. coli* und *Bacillus* sp.

Ätherisches Öl	MHK für <i>E. coli</i> **	MHK für <i>Bacillus</i> sp.**
Ol. Caryophylli	1 : 1	1 : 3
Eugenol	1 : 1	1 : 3
Zimtalkohol	1 : 3	1 : 1
Zimtaldehyd	1 : 7	1 : 7
Zimtsäure (pH 5,5)	-	-
Zimtsäure (pH 7,3)	-	-
Vanillin	1 : 3	1 : 3
Ol. Menth. pip.	-	1 : 0
Geraniol	1 : 0	1 : 1
Citral	-	1 : 3

**Zahlenangabe: Verhältnis von "ätherischer Ölbouillon"
zu "normaler Bouillon".

- : Keine antimikrobielle Wirkung.

7.3. Konservierungsbelastungstest

Mit den als wirksam erkannten ätherischen Ölen wurde ein KONSERVIERUNGSBELASTUNGSTEST in der Weise durchgeführt, daß man Komprimat mit einer bestimmten Konservierungsmittelkonzentration herstellt, und diese nach WALLHÄUSSER (128) in einem modifizierten Plättchen-Test auf konservierende Wirkung untersucht. Im einzelnen geht man folgendermaßen vor:

7.3.1. Tablettenherstellung

Es werden Tabletten nach folgender Grundrezeptur hergestellt:

Pankreatin Feuchtgranulat**	83 T
Avicel® PH 101	9 T
Ac-Di-Sol®	3 T
Magnesiumstearat	1 T
Aerosil® 200	0 - 4 T
ätherisches Öl***	0 - 2 T

Für die Einarbeitung des ätherischen Öles wird zunächst eine 1:1 Verreibung mit Aerosil® 200 hergestellt. Um unterschiedliche Geruchsstoffkonzentrationen zu erhalten, setzt man die Verreibung und das Aerosil® 200 wie folgt der Tablettenmischung zu:

Verreibung (1:1)	Aerosil® 200
4	0
2	2
1	3
0,4	3,6

So erhält man Tabletten mit einer Geruchsstoffkonzentration von 2 %, 1 %, 0,5 % und 0,2 %. Die Tablettenmischung läßt sich auf einer Exzenterpresse (Exakta 1) mit 16 mm Stempeln (Preßkraft: 15 kN/75 MPa) gut zu 500 mg-Tabletten verpressen. Die verhältnismäßig großen Werkzeuge wurden gewählt, um bei der späteren mikrobiologischen Testung eine große Kontaktfläche zwischen Tabletten und Agar zu erhalten.

** Manuell mit ERWEKA-Hilfsmotor AR 400 unter Einsatz von 1 mm Sieben. Granulationsflüssigkeit: Isopropanol/H₂O = 88/12.

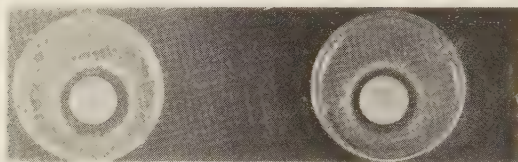
*** Es wurden die auf Seite 179 aufgeführten Substanzen geprüft.

7.3.2. Mikrobiologische Testung

Die Prüfung einer ausreichenden Konservierung wurde nach drei Verfahren durchgeführt:

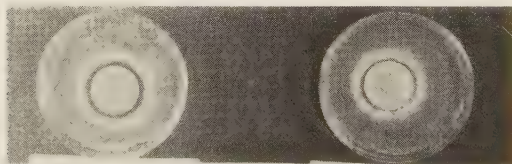
1. Hemmhofbildung

CSP-Nährböden wurden mit einer Keimsuspension^{**} beimpft, Tabletten aufgelegt und 18 Stunden bei 310 K (37 °C) bebrütet und anschließend die Hemmhofbildung beurteilt. Abbildung 97 zeigt exemplarisch die Verhältnisse für Zimtsäure drei Monate nach Herstellung der Tabletten.



Zimtsäure 2 Prozent

Zimtsäure 1 Prozent



Zimtsäure 0,5 Prozent

Zimtsäure 0,2 Prozent

Abb. 97 Hemmhofbildung für Zimtsäure drei Monate nach Herstellung.

^{**} 1 g Pankreatin auf 50 ml CSP-Bouillon; 20 Stunden bebrütet; Keimgehalt 10^8 KBE/ml.

2. Spontanes Schimmelpilzwachstum

Die zu untersuchenden Tabletten wurden auf Sabouraud-Nährböden* gelegt und nach 14 Tagen auf Schimmelpilzwachstum geprüft (298 K/25 °C).

3. Spontanes Bakterienwachstum

Preßlinge wurden aus CSP-Platten gelegt, 48 Stunden bei 310 K (37 °C) bebrütet und danach geprüft, ob von der Tablette ein Bakterienwachstum ausging.

Die Prüfungen 1 und 2 wurden nach 1 Tag, 1, 2 und 4 Wochen, 3 und 6 Monaten durchgeführt; Prüfung 3 nach 1 Tag und 6 Monaten.

7.3.3. Resultate

Die Ergebnisse des "Konservierungsbelastungstests" zeigt Tabelle 16.

- Eine gute "Konservierung" der Pankreatintabletten erhält man mit:

2 % Zimtalkohol

2 % Zimtsäure

* Dem Sabouraud-Agar mußten zur Verhinderung eines Bakterienwachstums 4 mg% Chloramphenicol zugesetzt werden.

Tabelle 16 Konservierungsbelastungstest - durchgeführt an Tabletten mit verschiedenen Konzentrationen an ätherischem Öl (nach WALLHÄUSSER (128)).

		Ein Tag			1 Woche		2 Wochen		4 Wochen		12 Wochen		26 Wochen		
Nelkenöl	2 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1 %	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
	0,5 %	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
	0,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Eugenol	2 %	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1 %	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
	0,5 %	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
	0,2 %	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zimtalkohol	2 %	+	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+	+	++	+
	1 %	-	+	-	-	+	+	+	+	+	++	+	+	-	+
	0,5 %	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
	0,2 %	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Zimtaldehyd	2 %	++	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+
	1 %	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	0,5 %	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	0,2 %	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Zimtsäure	2 %	++	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+	++	+
	1 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+
	0,5 %	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
	0,2 %	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Vanillin	2 %	++	+	+	++	+	++	+	+	+	-	+	+	-	+
	1 %	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	0,5 %	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	0,2 %	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+

		Ein Tag			1 Woche		2 Wochen		4 Wochen		12 Wochen		26 Wochen	
Pfefferminzol	2 %	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
	1 %	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	0,5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	0,2 %	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Geraniol	2 %	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	1 %	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	0,5 %	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	0,2 %	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Citral	2 %	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
	1 %	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,5 %	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	0,2 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. Spalte: Hemmhofbildung ++ : Gute Wachstumshehmung
+ : Wachstumshehmung
- : Keine Wachstumshehmung

2. Spalte: Spontanes Pilzwachstum
+ : Kein Wachstum
- : Wachstum

3. Spalte: Spontanes Bakterienwachstum
+ : Kein Wachstum
- : Wachstum

- Eine befriedigende "Konservierung" erhält man mit:

- 2 % Zimtaldehyd
- 2 % Ol. Caryophylli
- 2 % Eugenol
- 1 % Zimtsäure

- Nicht ausreichend für eine "Konservierung" sind:

Ol. Menthae pip.
 Vanillin
 Geraniol
 Citral

Auffällig und aufgrund der Screening-Untersuchungen nicht vorhersehbar war die relativ geringe Wirkung des Citrals und die im Verlauf der Lagerung stark nachlassende Wirkung von Zimtaldehyd und Vanillin. Obwohl in unserem Arbeitskreis (13) Citral und andere Terpenaldehyde, solubilisiert in Saftgrundlagen, gegenüber zahlreichen Mikroorganismen gute Wirksamkeit zeigten, dürften im vorliegenden Fall durch den extrem hohen Proteinanteil die Carbonylverbindungen mit dem Protein reagieren und somit die antimikrobielle Potenz inhibieren. Erwähnt sei in diesem Zusammenhang der sog. Eiweiß-Faktor, der bei der Beurteilung von aldehydhaltigen Desinfektionsmitteln berücksichtigt werden muß (127/129).

Im Gegensatz dazu reagieren Zimtsäure und Zimtalkohol praktisch nicht mit den Pankreatin-Proteinen (siehe Abbildung 98), so daß ihre gute Wirksamkeit dadurch erklärt werden kann.

7.3.4. Bestimmung der Verfärbung von geruchsstoffhaltigen Pankreatintabletten

Unter der Prämisse einer Reaktion zwischen Aldehyden und Proteinen müßte es, ebenso wie bei Einwirkung höherer Temperaturen, zu einer Verfärbung des eiweißhaltigen Materials kommen. Hingewiesen sei z.B. auf die hautbräunende Wirkung von Dihydroxyacetone (57/130).

Alle aldehydhaltigen Tabletten zeigten nach Lagerung von 4 Monaten z.T. starke Verfärbungen, die mittels des in 3.2.3. beschriebenen Chromatogramm-Spektralphotometers KM3 (C. ZEISS) quantitativ erfaßt werden konnten. Abbildung 98 zeigt die Verfärbung der Pankreatin-Tabletten in Abhängigkeit von der Geruchsstoffkonzentration.

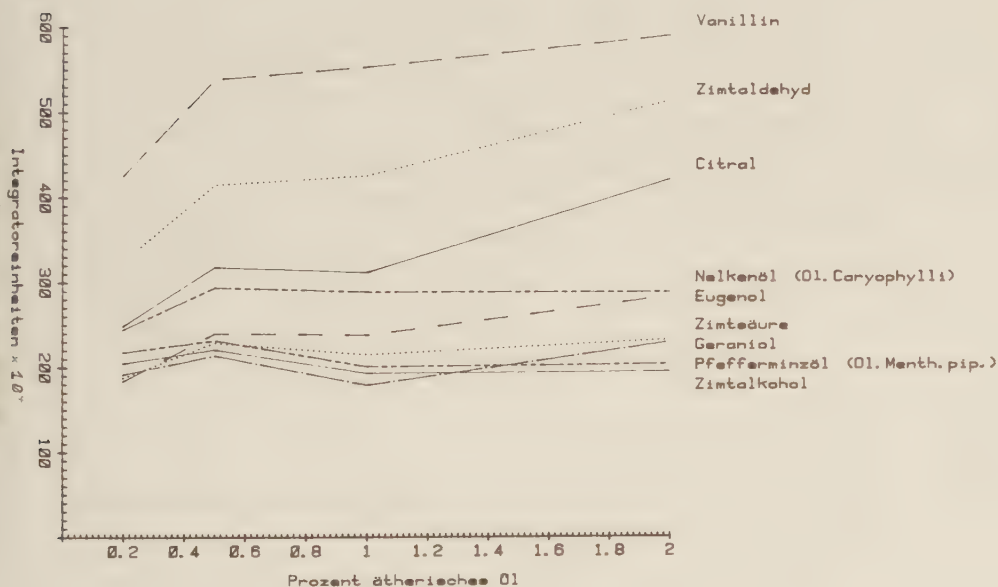


Abb. 98 Verfärbungsgrad von Tabletten in Abhängigkeit von dem Gehalt an ätherischem Öl, 4 Monate nach Herstellung, gemessen mit einem DC-Spektralphotometer KM3 (C. ZEISS) bei 405 nm.

In Übereinstimmung mit den Aussagen gemäß 7.3.3. findet bei Zimtsäure und Zimtalkohol nach 4 Monaten Lagerung bei Zimmertemperatur keine meßbare Veränderung statt. Umgekehrt zeigen

Pankreatin-Tabletten, die Aldehyde (Vanillin, Zimtaldehyd oder Citral) enthielten, eine starke Verfärbung, die mit einer Reaktion des Geruchsstoffs mit dem Protein erklärt werden kann.

Diese Annahme findet ihre prinzipielle Bestätigung in geringeren Amylaseaktivitätswerten, die in Mustern mit starker Verfärbung gefunden wurden:

	Aktivitätsverlust	Verfärbung Integratoreinheiten
Zimtaldehyd 2 %	17,4 %	$515 \cdot 10^4$
Vanillin 2 %	14,8 %	$592 \cdot 10^4$
Zimtsäure 2 %	11,3 %	$233 \cdot 10^4$
Pfefferminzöl 0,2 %	8,7 %	$220 \cdot 10^4$
Leerwert	8,7 %	$207 \cdot 10^4$

7.3.5. Zusammenfassung

Zimtalkohol und Zimtsäure* je 2 % sind für eine Konservierung von Pankreatin-Tabletten am besten geeignet. Dies weil sie

- im Konservierungsbelastungstest gute Wirksamkeit zeigen.
- Mit den Proteinen des Pankreatins keine ausgeprägten Reaktionen zeigen, und somit
- nur eine geringe enzyminaktivierende Wirkung besitzen.

* In der Literatur wird Zimtsäure ähnlich wie Benzoesäure als Konservierungsmittel für Lebensmittel und orale Arzneiformen beschrieben (131/132).

7.4. Einfluß der Preßkraft auf die Keimzahlen
von Komprimaten

Wie beschrieben, wird biologisches Material bei der Verpressung geschädigt. Wenn diese Tatsache für Proteine vom Typ des Pankreatins zutrifft, so müßte auch vitales Material wie z.B. Mikroorganismen durch einwirkende mechanische Kräfte grundsätzlich geschädigt werden. Keimzahlbestimmungen der unter 4.4. bei verschiedenen Preßkräften und Preßtemperaturen hergestellten Komprimata ergaben, daß die KBE/g mit zunehmender Preßkraft und Preßtemperatur abnehmen. Die Werte sind in Tabelle 18 Anhang aufgeführt. Für genauere Untersuchungen wurde hochkontaminiertes Pankreatin²² auf einer instrumentierten Exzenterpresse (Exakta 1) mit verschiedenen definierten Preßkräften tablettiert.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 99.

²² Als zweckmäßig erwies sich die Kontamination mit *Bacillus* spezie, einem aus Pankreatin isolierten Mikroorganismus. Beimpfte man mit *E. coli*, *Staph. aureus* oder *P. aeruginosa*, so nahm die Keimzahl schon im Pankreatin selbst stark ab, was aufgrund des "wasserarmen" Milieus nicht verwunderlich ist. Beimpfte man hingegen mit *Bacillus* spezie, blieb die Keimzahl konstant.

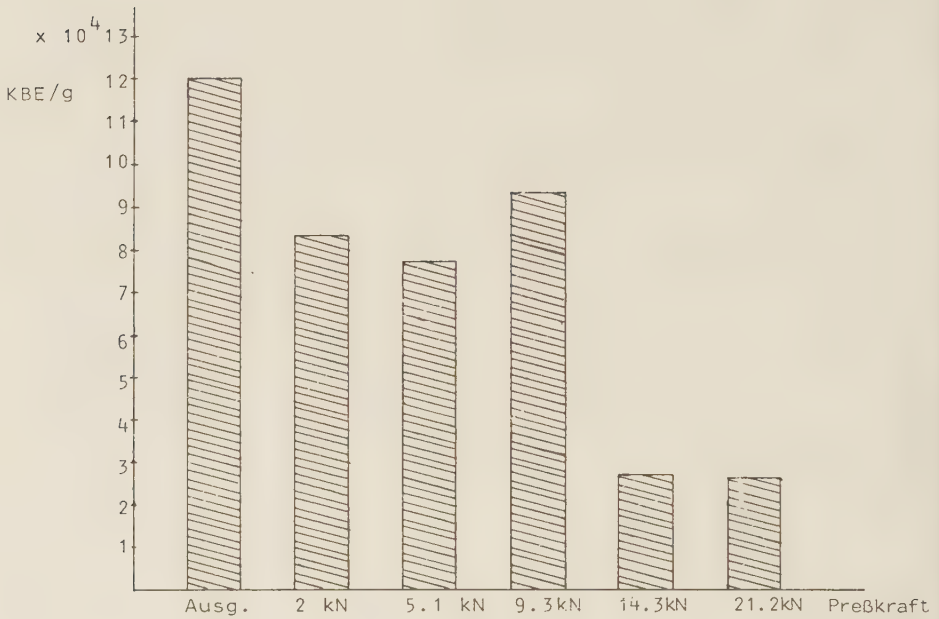


Abb. 99 Abnahme der Keimzahl (*Bacillus species*) in Abhängigkeit von der angewandten Preßkraft (Preßdruck).

* Die Methode zur Bestimmung der KBE ist unter 9.2.3. beschrieben.

Es zeigt sich also, daß:

- Bis zu einer Preßkraft von ca. 10 kN (90 MPa) die keimreduzierende Wirkung nur gering ist.
- Bei einer erhöhten Preßkraft, ab ca. 14 kN (125 MPa), wie sie auch bei der Tablettenproduktion üblich ist, die Keimzahl um ca. eine Zehnerpotenz erniedrigt wird.
- Auch bei höheren Preßkräften Keimzahlen in Höhe von ca. $2 < 10^4$ KBE/g gefunden werden.

Somit bestätigte sich, daß mit der Tablettierung eine Keimreduzierung verbunden ist.

Durch eine Erhöhung der Preßkraft bei der Herstellung von Pankreatin-Preßlingen werden also nicht nur die "Verdauungsenzyme" inaktiviert, sondern auch die Keimzahl signifikant gesenkt. Dennoch gelingt es nicht, unter üblichen Produktionsbedingungen stärker kontaminiertes Ausgangsmaterial sicher auf tolerierbare Werte zu senken. Deshalb besteht die Berechtigung, Geruchsstoffe wie Zimtalkohol und Zimtsäure als Hilfstoffe zur Verbesserung der mikrobiologischen Qualität von stärker kontaminierten Enzymkomprimaten einzusetzen.

8. Zusammenfassung

Das Proteingemisch Pankreatin verliert bei der Tablettierung bis zu 30 % seiner enzymatischen Aktivität. Als Ursache für diese Verluste werden thermische und mechanische Vorgänge diskutiert. Am Beispiel des Leitenzyms α -Amylase konnte gezeigt werden, welche Parameter für die Inaktivierung maßgeblich sind.

Das Untersuchungsmaterial, ein unverarbeitetes Pankreatin "4 x NF" und ein Trockengranulat, wurden zunächst mit herkömmlichen Methoden der Pulveranalyse charakterisiert. Da über die bei der Komprimierung auftretenden Verformungserscheinungen - plastische oder elastische Deformation - in der Literatur keine Angaben zu finden waren, wurden polarisations- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Ausgangssubstanzen durchgeführt.

Rohpankreatin ist ein amorphes, voluminöses Pulver, das durch Trockengranulation in ein gut tablettierbares Produkt überführt werden kann. Bei diesem Verdichtungsprozeß sowie bei der anschließenden Tablettierung, in deren Verlauf Preßdrücke (Preßkräfte) von ca. 150 MPa (15 kN/cm²) einwirken, kommt es, wie die REM-Untersuchungen ergaben, zu einer Fusion der einzelnen Partikel. Von der filigranartigen Struktur des Ausgangsmaterials ist nichts mehr zu erkennen und es treten α -Amylaseaktivitätsverluste von ca. 8 % bei der Trockengranulation und ca. 7 % im Zuge der Tablettierung auf.

Um das Wesen der Inaktivierung beschreiben zu können, mußten zunächst die Zersetzungsgeschwindigkeitskonstanten bei

thermischer
tribomechanischer und
druckbedingter

Beanspruchung von Pankreatin-Pulver bestimmt werden.

Es zeigte sich, daß die α -Amylase bei trockenem Erwärmen bis zu einer Temperatur von 333 K (60 °C) über den Zeitraum von 60 min stabil war. Bei Temperaturen zwischen 333 K (60 °C) und 373 K (100 °C) zersetzte sich das Enzym exponentiell nach einer Reaktion erster Ordnung.

Die tribomechanische Zersetzung verlief ebenfalls nach dieser Reaktionsordnung.

Interessant war die Feststellung, daß bei der Verpressung die α -Amylaseaktivität zwar vom Preßdruck (Preßkraft), nicht aber von der Druckhaltezeit beeinflusst wurde. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, daß die zur Matrixbildung führende Verformung sehr rasch erfolgt.

Ebenso wie die Enzymaktivität war die scheinbare Dichte der Kompaktlinge im wesentlichen nur vom Preßdruck (Preßkraft), dagegen weniger von der Druckhaltezeit abhängig. Scheinbare Dichte und α -Amylaseaktivität waren indirekt proportional. Die Enzymdenaturierung korreliert somit mit einer Volumenverminderung.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß thermische Vorgänge bei der Komprimierung auf die α -Amylaseaktivität und parallel auf die Tabletteneigenschaften ausüben. Dazu wurde das Pankreatin-Trockengranulat auf einer kühlbaren Hochleistungs-Rundlaufpresse bei verschiedenen Temperaturen, Leistungen und Preßdrücken (Preßkräften) tablettiert.

Je nach Kühlbedingungen und Leistung resultierten Tabletten mit Oberflächentemperaturen von 285 K (12 °C) bis 310 K (37 °C). Die α -Amylaseaktivität und die Tablettenkennzahlen waren stark von der Preßtemperatur und von dem Preßdruck (Preßkraft) abhängig. Bei einer unter Kühlung der Maschine und des Preßgutes durchgeführten Komprimierung mit ca. 300 MPa (30 kN/cm²) resultierten etwa die Tabletteneigenschaften wie bei einer Tablettierung ohne Kühlung mit ca. 150 MPa (15 kN/cm²).

REM-Aufnahmen zeigten, daß bei der Verpressung unter Kühlung das Tablettiergut primär mechanisch verformt wird, auch bei hohen Preßdrücken sind noch Strukturen zu erkennen. Verpreßt man dagegen bei Raumtemperatur, so kommt es bei der Matrixbildung zu ausgeprägten Sintervorgängen.

Die Qualität von Enzymzubereitungen kann erst nach gründlichen Stabilitätsuntersuchungen beurteilt werden. Im vorliegenden Fall war es überraschend, daß sich nach einem halben, bzw. einem Jahr die mit gleichem Preßdruck (Preßkraft) aber unterschiedlicher Preßtemperatur hergestellten Tabletten hinsichtlich ihrer Aktivität angleichen. Als Erklärung für diese Beobachtung muß ein Mehrstufenprozeß für die Inaktivierung angesehen werden. Verpreßt man bei Raumtemperatur, wird Pankreatin im wesentlichen plastisch verformt, die Denaturierung im Zuge einer Enzymdeformation wird unmittelbar nach Herstellung manifest. Bei einer Tablettierung unter Kühlung ist der Bereich der plastischen Verformung kleiner, die Enzymdeformation ist zunächst reversibel. Erst bei Lagerung "altert" das Enzym an den vorgeschädigten Bezirken.

Primär für die Enzyminaktivierung ist also die Volumenverringerng im Augenblick der Verpressung, sekundär wirken sich Temperatur- und Alterungsprozesse auf die α -Amylaseaktivität aus.

Weiterführende Untersuchungen auf einer vollinstrumentierten Exzenterpresse ergaben, daß Pankreatin unter Normalbedingungen im wesentlichen plastisch verformt wird.

Zur quantitativen Erfassung der Enzymschädigung durch einwirkende mechanische und thermische Energien wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt:

Auf der vollinstrumentierten Tablettenpresse wurde die umgesetzte mechanische Energie E_2 ermittelt. Die gleichgroße Energiemenge Q konnte dann, nach Ermittlung der spezifischen Wärme für Pankreatin, in der DTA zugeführt werden. Ein Energiebetrag,

der im Zuge der Tablettierung zu einem α -Amylaseaktivitätsverlust von ca. 12 % führte, bewirkte bei gleich großer thermischer Belastung keine Enzyminaktivierung.

Daß es weder bei thermischer noch bei mechanischer Denaturierung zu einer Spaltung von Peptidbindungen kommt, zeigten gelelektrophoretische und gelfiltrationschromatographische Untersuchungen. In beiden Fällen konnten keine Proteinbruchstücke nachgewiesen werden.

Auf herkömmlichen Tablettenmaschinen ist also eine Enzymdeformation für die Inaktivierung verantwortlich. Um diese Deformation zu verhindern, bot sich ein neuartiges Preßprinzip an, bei dem in Silicongummimatrizen quasilisostatisch verpreßt wurde. Genauere Untersuchungen ergaben, daß dieses Verfahren zur Verarbeitung von Pankreatin gewisse Vorteile aufweist. Zwar konnten keine einzeldosierten Arzneiformen hergestellt werden, dennoch war es möglich, ein Granulat mit guten galenischen Eigenschaften bei geringer Enzyminaktivierung herzustellen.

Im letzten Teil der Arbeit sollte ein Konservierungsmittel aus der Reihe der ätherischen Öle gefunden werden, welches bei guter antimikrobieller Wirkung eine geringe Enzyminaktivierung bewirkt. Ein Konservierungsbelastungstest über die Dauer von 6 Monaten zeigte, daß Zimtsäure und Zimtalkohol diesen Anforderungen weitgehend gerecht werden. Die für andere galenische Zubereitungen gut wirksamen Aldehyde Zimtaldehyd, Vanillin und Citral waren ungeeignet, da sie mit den Proteinen des Pankreatins reagierten, so zu Enzyminaktivierungen führten und selbst ihre antimikrobielle Wirkung verloren.

9. Anhang

9.1. Tabellen

Tabelle 17 α -Amylaseaktivitäten der auf einer gekühlten Rundlaufpresse hergestellten Pankreatintabletten 0,5, 6 und 12 Monate nach Herstellung.

Versuchsnummer (Preßkraft / Tablettentemp.)		Amylaseaktivität in FIP-E/mg nach		
		0,5	6	12 Monaten
kN	K			
1a	(15,1 / 287)	31,1 (- 3,7 %)	29,7 (- 8,0 %)	28,9 (- 10,5 %)
1b	(14,7 / 284)	31,0 (- 4,0 %)		28,6 (- 11,5 %)
2	(15,1 / 291,5)	30,9 (- 4,3 %)	30,2 (- 6,5 %)	29,7 (- 8,0 %)
3a	(16,3 / 304,1)	29,9 (- 7,4 %)	29,4 (- 9,0 %)	29,2 (- 9,6 %)
3b	(14 / 310,5)	29,4 (- 9,0 %)	29,1 (- 9,9 %)	29,1 (- 9,9 %)
4	(15,6 / 300)	30,2 (- 6,5 %)	29,6 (- 8,4 %)	29,2 (- 9,6 %)
5a	(15,1 / 292,5)	30,5 (- 5,6 %)	29,5 (- 8,7 %)	28,5 (- 11,8 %)
5b	(15,1 / 285,4)	31,0 (- 4,0 %)		29,1 (- 9,9 %)
5c	(29,6 / 291,7)	28,5 (- 11,8 %)	27,8 (- 14,0 %)	27,4 (- 15,2 %)
*6a	(14,4 / 283,9)	31,0 (- 4,0 %)	29,3 (- 9,3 %)	29,2 (- 9,6 %)
*6b	(26,8 / 289,9)	28,5 (- 11,8 %)		26,6 (- 17,6 %)
*6c	(29,6 / 290,9)	28,3 (- 12,4 %)		26,7 (- 17,3 %)
*6d	(34,1 / 292,2)	28,6 (- 11,5 %)	27,9 (- 13,6 %)	26,7 (- 17,3 %)
*7a	(15,1 / 285,9)	30,3 (- 6,8 %)		28,5 (- 12,3 %)
*7b	(18,2 / 287,4)	29,3 (- 9,8 %)		28,3 (- 12,9 %)
*7c	(24,1 / 289,6)	28,5 (- 12,3 %)		28,2 (- 13,2 %)
*7d	(31,9 / 291,5)	28,0 (- 13,8 %)		27,1 (- 16,6 %)
Trockengranulat N		32,2	31,7 (- 1,9 %)	30,6 (- 5,3 %)

* Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Aktivitäten um 5 bzw. 0,4 % erhöht, da dem Trockengranulat N für die Versuche 6 5 % Elcema P100 und für die Versuche 7 0,4 % Aerosil 200/01. Menthae pip. zugesetzt wurden. Auf die Enzymstabilität hatten die Zusätze keinen Einfluß.

Tabelle 18 Tablettenkennzahlen der auf einer gekühlten Rund-
laufpresse hergestellten Pankreatintabletten.

Versuchsnummer (Preßkraft / Tablettentemp.)	K	scheinbare Dichte (ρ_{sch}) g/cm ³	wahre Dichte (ρ)	Porosität (c) %	Bruchfestig- keit N	Bruchfestigkeit 1 Jahr nach Her- stellung N	Integratorein- heiten $\times 10^4$
1a (15,1 / 287)		1,07	1,37	21,9	149	-	194,7
1b (14,7 / 284)		0,91	1,43	36,4	68	107	173,2
2 (15,1 / 291,5)		1,1	1,40	21,4	207	199	205,8
3a (16,3 / 304,1)		1,13	1,39	18,7	209	252	219,5
3b (14 / 310,5)		1,13	1,40	19,3	198	240	235,8
4 (15,6 / 300)		1,10	1,41	22,0	165	184	218,2
5a (15,1 / 292,5)		1,09	1,37	20,4	128	144	220,1
5b (15,1 / 285,4)		1,05	1,41	25,5	115	129	200,8
5c (29,6 / 291,7)		1,15	1,40	17,9	190	204	237,3
6a (14,4 / 283,9)		1,06	1,40	24,3	97	106	186,6
6b (26,8 / 289,9)		1,14	1,39	18,0	186	204	218,5
6c (29,6 / 290,9)		1,16	1,41	17,7	191	208	229,7
6d (34,1 / 292,2)		1,18	1,38	14,5	200	214	229,6
7a (15,1 / 285,9)		1,07	1,40	23,6	125	149	200,7
7b (18,2 / 287,4)		1,12	1,42	21,1	171	196	215,9
7c (24,1 / 289,6)		1,14	1,43	20,3	218	201	225,7
7d (31,9 / 291,5)		1,15	1,41	18,4	209	235	235,0

Fortsetzung Tabelle 18

Versuchsnummer	$\bar{x}$ mg	s_{rel} %	Friabilität (10 min) %	Zerfallszeit min. (H ₂ O 37 °C)	Keimzahl (KBE/g)
1a	447,2	1,4	0,11	81	2.300
1b	472,5	5,4	7,4	78	—
2	499,3	2,2	0,18	90	2.000
3a	465,7	3,3	0,23	91	800
3b	462,4	5,0	0,2	90	—
4	473,4	2,2	0,21	90	1.500
5a	461,8	2,2	0,11	93	1.600
5b	463,9	2,0	0,11	82	1.500
5c	461,7	2,5	0,25	105	900
6a	450,5	3,3	0,12	100	1.500
6b	451,6	3,2	0,2	100	1.300
6c	454,9	2,2	0,2	100	1.100
6d	454,4	2,2	0,21	98	800
7a	462,8	4,7	0,13	80	1.100
7b	466,5	3,2	0,1	95	800
7c	475,6	2,5	0,0	85	1.300
7d	476,1	2,1	0,14	98	900
Trockengranulat N					1.600
Trockengranulat N + Elcema					2.300
Trockengranulat N + Pfefferminzöl					2.100

Tabelle 19 Tablettenkennzahlen der nach 4.5. hergestellten Tabletten

Preßkraft kN (Preßdruck MPa)	$\bar{x}$ (mg)	s_{rel} %	Bruchfestigkeit N	Friabilität %	Zerfall	
					H ₂ O	37 °C/min
1,4 (10,5)	369	4,2	65	0,3		43
2,5 (18,8)	374	1,9	110	0,3		36
11 (82,7)	371	4,9	> 150	0,0		40
18 (135,3)	362	2,8	> 150	0,1		47

9.2. Arbeitsvorschriften

9.2.1. Bestimmung der Pankreasenzyme

9.2.1.1. Bestimmung der α -Amylase nach der F.I.P.-Methode (24/26)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bestimmung der durch Hydrolyse von Stärke freiwerdenden reduzierenden Gruppen. Aus Gründen der Genauigkeit und Einfachheit wird die jodometrische Methode bevorzugt. Unabhängig von der Größe des Saccharids reagiert Jod stöchiometrisch mit reduzierenden Gruppen und ergibt ein exaktes Maß für die Zahl der gespaltenen glukosidischen Bindungen.

Definition der Einheit

1 FIP-Amylase-Einheit ist definiert als die Enzymmenge, die unter den Versuchsbedingungen Stärke mit einer Anfangsgeschwindigkeit spaltet, daß pro Minute 1 Mikroäquivalent an glukosidischen Bindungen hydrolysiert wird.

Reagenzien

1) Substrat

Eine Stärkemenge, die 5 g wasserfreier Stärke entspricht, wird unter Kochen in 400 ml Aqua dest. gelöst; nach Abkühlen auf 293 K (20 °C) in einem 500 ml Meßkolben überführt und entsprechend aufgefüllt. Die Substratlösung muß täglich frisch hergestellt werden.

2) Puffer: 0,2 M Phosphat-Puffer pH 6,8

Die Herstellung des Puffers geschieht durch Mischen von 510 Teilen der Lösung a mit 490 Teilen der Lösung b. Falls notwendig, muß der Puffer auf pH 6,8 $\pm$ 0,1 eingestellt werden.

Lösung a: 27,28 g KH_2PO_4 ad 1000,0 ml Aqua dest.

Lösung b: 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1000,0 ml Aqua dest.

3) 0,2 M NaCl-Lösung; 1,168 ad 100 ml Aqua dest.

4) 1 N Salzsäure

5) 0,1 N Jodlösung

6) 0,1 N Natronlauge

7) 20proz. Schwefelsäure

8) 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung

9) Enzymlösung

500 mg Pankreatin (Tabletten oder Pulver) werden mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 in einer Reibschale suspendiert. Es muß darauf geachtet werden, daß das Proteingemisch nur feucht verrieben wird. Die Suspension führt man vorsichtig in einen 100 ml Kolben über und füllt mit Puffer auf. Danach wird nochmals 1:10 verdünnt. Die Enzymkonzentration der hergestellten Suspension liegt zwischen 10 und 20 FIP-Amylase-Einheiten/ml. Die Extraktion erfolgt über einen Zeitraum von 30 min. Anschließend muß die Enzymlösung sofort analysiert werden.

Verfahren

1) Probe

25 ml Substratlösung werden in ein Reagenzglas (ca. 22 x 200 mm) pipettiert, danach werden 10 ml Puffer und 1 ml NaCl-Lösung hinzugefügt. Das Reagenzglas wird mit einem

Gummistopfen verschlossen und in einen Wasserthermostat bei 298 K (25 °C) gebracht.

Sobald die Temperatur der Substratmischung auf 298 K (25 °C) angestiegen ist, wird 1 ml Enzymlösung hinzugefügt und gleichzeitig eine Stoppuhr in Betrieb gesetzt. Nach dem Schütteln wird das Testgemisch wieder in den Thermostat gebracht. Genau 10 min nach Zugabe des Enzyms wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Salzsäure unterbrochen. Die Mischung wird in einen 300 ml Jodzahlkolben überführt und das Reagenzglas mit wenig Aqua dest. nachgespült. Unter mechanischem Rühren werden 10 ml 0,1 N Jodlösung und unmittelbar darauf 45 ml 0,1 N NaOH zugegeben. Diese Lösung wird 15 min in völliger Dunkelheit stehen gelassen. Dann werden 4 ml 20proz. Schwefelsäure zugegeben. Anschließend wird die Lösung mit 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert.

In Abbildung 100 sind die einzelnen Verfahrensschritte zusammengefaßt.

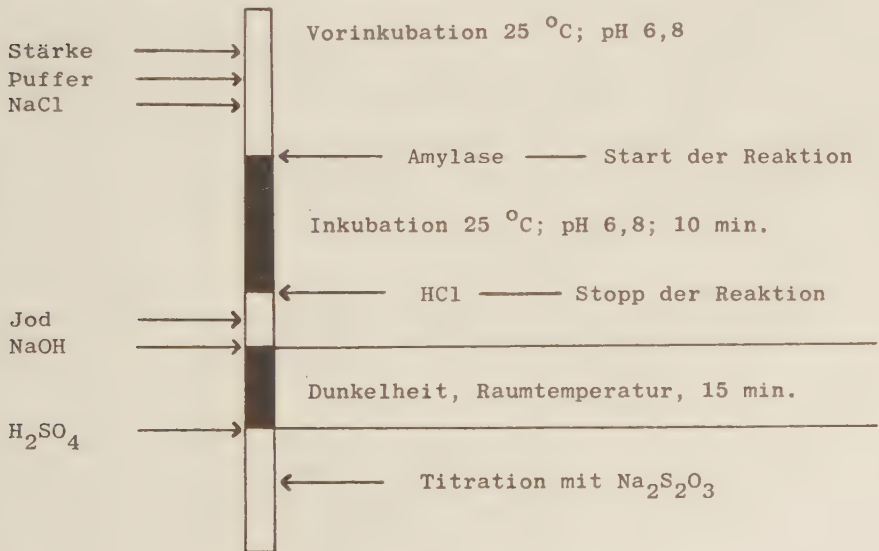


Abb. 100 Schematische Darstellung der α -Amylasebestimmung nach F.I.P. (15).

2) Blindansatz

Das unter Probe beschriebene Verfahren wird mit dem Unterschied angewendet, daß die Salzsäure der Substratmischung zum "Nullpunkt" hinzugegeben wird. Unmittelbar darauf wird die Enzymlösung zupipettiert.

Berechnung

Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Stärke hydrolisierenden pankreatischen Amylase hat eine hyperbolische Form. Die reziproken Werte der hydrolisierten Stärkemenge und der Enzymkonzentration stehen unter den Versuchsbedingungen in annähernd linearem Verhältnis zueinander. Die Gleichung dieser Geraden wird zur Berechnung der Enzymaktivitäten aus den Titrationswerten verwendet.

Bei einem Verbrauch von a ml 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung für die Titration der Probe und von b ml für die Titration des Blindansatzes ergibt sich folgende Formel für die Aktivität pro ml Enzymlösung:

$$\frac{5}{1 - \frac{5}{0,05} \left(\frac{b}{b-a} - \frac{a}{b-a} \right)} = \text{FIP-Amylase-Einheiten/ml} \quad \text{Gl. 15}$$

Multipliziert man den erhaltenen Wert mit

$$k = \frac{10 \cdot 100}{\text{Einwaage}}$$

erhält man für die beschriebene Bestimmung die FIP-Amylase-Einheiten pro mg analysiertes Pankreatin.

Statistik

Um vergleichbare und reproduzierbare Werte zu erhalten, werden pro Analyse parallel zum Blindwert 4 Proben bestimmt und zwar:

- 1) FIP-Amylase-Standard
- 2) Probe A
- 3) Probe B
- 4) Referenz

Der FIP-Standard ergibt die Beziehung zur wahren Aktivität. Wird ein vom deklarierten Wert abweichendes Ergebnis erhalten, so wird der Korrekturfaktor

$$f = \frac{\text{wahrer Wert}}{\text{gefundener Wert}}$$

berechnet. Indem man die restlichen Proben mit diesem Faktor multipliziert, können z.B. Reagenzieneinflüsse eliminiert werden.

Die mitgeführten Referenzwerte verschiedener Analysen können statistisch ausgewertet werden, so daß Aussagen über die Vergleichbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Bestimmung gemacht werden können.

Tabelle 20 zeigt die statistische Auswertung für verschiedene, im Laufe dieser Arbeit durchgeführte Versuchsreihen.

Tabelle 20 Statistische Auswertung

$\bar{x}$ FIP-E/mg	s FIP-E/mg	$s_{rel} \%$	m_{95} FIP-E/mg	m_{99} FIP-E/mg	
29,34	0,78	2,6	$\pm 0,44$	$\pm 0,61$	MERCK, Febr. 1982 (14 Tabletten)
28,14	0,67	2,4	$\pm 0,67$	$\pm 1,01$	MERCK, Febr. 1982 (6 Tabletten)
31,7	0,98	3,1	$\pm 0,54$	$\pm 0,75$	MERCK, Febr. 1982 (Granulat 15 Werte)
31,01	0,52	1,7	$\pm 0,37$	$\pm 0,53$	FETTE, Sept. 1981 (10 Tabletten)
32,27	0,45	1,4	$\pm 0,32$	$\pm 0,45$	FETTE, Sept. 1981 (Granulat 15 Werte)
28,9	0,61	2,1	$\pm 0,34$	$\pm 0,46$	FIP-Standard 1983 (15 Werte)

Probe A und B sind zufällig gezogene Stichproben von gleichartig behandeltem Pankreatin oder Pankreatinzubereitungen. Die erhaltenen Aktivitäten werden gemittelt und entsprechend der Untersuchung ausgewertet.

9.2.1.2. Bestimmung der Pankreaslipase nach dem F.I.P. Prinzip (24/26)

Die Lipase hydrolysiert Tri- und Diglyceride von Olivenöl. Man bestimmt die Enzymaktivität durch Titration der freigesetzten Carbonsäuren bei pH 9,0.

Definition der Einheit

1 FIP-Lipase-Einheit ist die Enzymmenge, die unter den Testbedingungen bei pH 9,0 und einer Temperatur von 310 K (37 °C) pro Minute ein Mikroäquivalent Säure freisetzt.

Reagenzien

1) Akaziengummilösung 10 % (G/V)

200,0 g Akazien-Gummi werden zu 2000 ml in Aqua dest. gelöst. Die trübe Lösung wird zentrifugiert, bis sie nur noch leicht opalesziert. Danach wird sie in Plastikbeutel zu 200 ml bei 253 K (-20 °C) eingefroren.

2) Substrat: Emulgiertes Olivenöl

20 ml Olivenöl (DAB 8 Qualität, Säurezahl 0 - 3) werden 15 min im Star-Mix mit 165 ml einer 10proz. Akazien-Gummi-Lösung und 15 g reinem zerkleinertem Eis emulgiert. Die Lösung und der Star-Mix müssen vorgekühlt sein. Die Arbeitstemperatur sollte 278 - 288 K (5 - 15 °C) betragen, sie darf 298 K (25 °C) auf keinen Fall überschreiten. Die Emulsion wird unter dem Mikroskop geprüft. Dazu verdünnt man 1 Teil Emulsion mit 10 Teilen Akazien-Gummi-Lösung und mißt die Öltröpfen mittels eines kalibrierten Okularmikrometers aus. Bei 90 % der Öltröpfchen sollte der Durchmesser unter 2 µm

liegen, bei keinem Teilchen über 20 μm . Die Emulsion ist im Kühlschrank etwa 10 Tage haltbar.

3) Lipaselösungsmittel

10 g NaCl, 6,06 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 4,9 g Maleinsäureanhydrid werden in 800 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wird mit 0,1 N NaOH neutralisiert, in einen Meßkolben gebracht und auf 1000,0 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Lösung ist im Kühlschrank 3 Tage haltbar.

4) Pufferlösung

60,6 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 234 mg NaCl werden in Aqua dest. gelöst und auf ein Volumen von insgesamt 100,0 ml aufgefüllt.

5) Natriumtaurocholat-Lösung 8 % (G/V)

In einem Becherglas werden 2 g Natriumtaurocholat (FIP-Qualität) in 20 ml Aqua dest. gelöst; diese Lösung führt man in einen 25 ml Meßkolben über und füllt auf das angegebene Volumen auf.

6) 0,05 N NaOH

7) Enzymlösung

Die Pankreatinsuspension sollte so zubereitet werden, daß 1 ml Suspension 12 FIP-Einheiten Lipase enthält. Dazu verreibt man ca. 200 mg Pankreatin vorsichtig und immer feucht in einer Reibschale mit 8 - 10 ml gekühltem Lipaselösungsmittel und läßt dann 10 min stehen. Die Suspension wird in einen 100 ml Kolben überführt und mit Lipaselösungsmittel aufgefüllt. Diese Mischung wird weiter 1:4 verdünnt. Kurz vor der Bestimmung muß die Mischung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Bestimmungsverfahren

In einem Erlenmeyerkolben werden 100 ml Olivenölemulsion, 80 ml Puffer, 20 ml Natriumtaurocholat-Lösung und 90 ml Aqua dest. miteinander vermischt. Die Mischung wird in einem Magnetrührer gerührt. Von dieser Lösung werden nun 29 ml in einen 100 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und auf 310 K (37 °C) temperiert. Mit 0,05 N NaOH wird die Mischung nun auf pH 9,2 gebracht. Nun gibt man 1 ml Enzymsuspension zu. Durch Zugabe von 0,05 N NaOH wird der pH-Wert 5 min lang auf pH 9,0 gehalten. Die Titration erfolgt unter Stickstoffatmosphäre oder in einem geschlossenen Gefäß, das mit einer mechanischen Rühreinrichtung - konstante Rührgeschwindigkeit - ausgestattet sein soll.

Der Verbrauch an NaOH wird jede Minute abgelesen. Unberücksichtigt bleibt der Verbrauch an NaOH innerhalb der ersten Minute, da die Titrationskurve in diesem Zeitraum noch nicht linear verläuft. Aus den letzten 4 Werten bildet man den Mittelwert und berechnet die FIP-Lipase-Einheiten folgendermaßen:

$$\frac{\left(\frac{b \cdot f}{2} \cdot 100 \right) \cdot 4 \cdot 100}{\text{Einwaage}} = \text{FIP-Lipase-Einheiten/mg} \quad \text{Gl. 16}$$

wobei b = Verbrauch an 0,05 N NaOH innerhalb 1 Minute

f = Faktor der 0,05 N NaOH

In gleicher Weise wie oben beschrieben wird der Standardwert bestimmt. Für die Standardbestimmung wiegt man etwa 60 mg ein. Die einzelnen Arbeitsschritte der Lipasebestimmung sind in Abbildung 101 schematisch dargestellt.

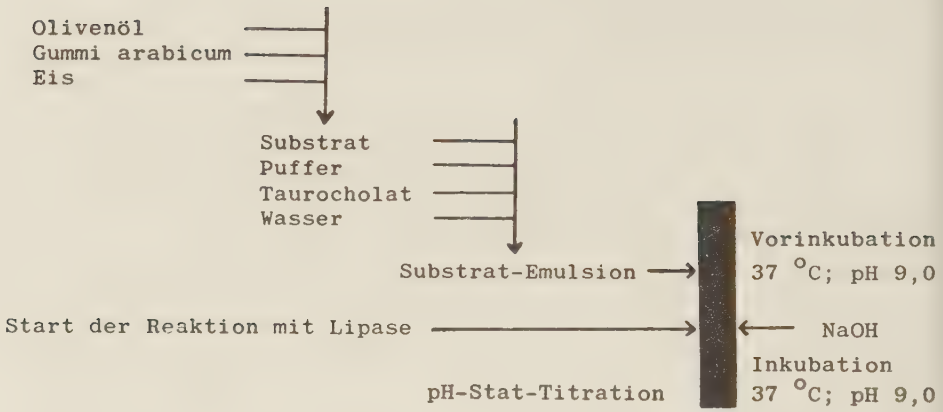


Abb. 101 Schematische Darstellung der Lipase-
Bestimmung nach F.I.P. (15)

9.2.2. Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese

Herstellung der Gele

Zwei gleichgroße Glasplatten bilden die Vorder- und Rückseite einer Doppelkammerküvette (siehe Abbildung 75). 1 mm hohe Glas- oder PVC-Streifen schließen die Küvette an den Seiten und nach unten ab; in der Mitte wird die Flachküvette durch einen Glasstreifen in zwei Kammern geteilt. Mit Agarosegel wird die Glas- küvette abgedichtet. Metallklammern fixieren die Anordnung. In diese Doppelkammer werden die Gele ausgegossen.

Das Trenngel

Als Trenngel verwendet man ein Gradientgel mit einer Acrylamidkonzentration von 5,6 zu 11,2 %. Dazu wird in die Glasküvette zuerst 1/2 - 1 cm 11,2proz. Trenngellösung eingefüllt. Danach läßt man über einen Gradientenmischer (siehe Abbildung 102) eine 5,6proz. und 11,2proz. Trenngellösung bis zu einer Höhe von ca. 6,5 cm zulaufen.

Die Lösungen werden aus Stammlösungen gemischt, die im Kühlschrank unter Lichtausschluß aufbewahrt werden müssen; frisch bereitet werden muß die Ammoniumpersulfat-Lösung.

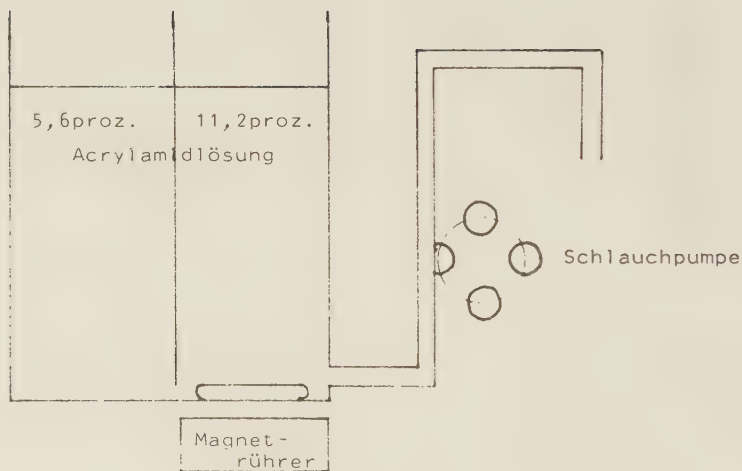


Abb. 102 Gradientenmischer

Gradiententrennigel 5,6 % - 11,2 %

	5,6 %	11,2 %
Lösung A	2 ml	2 ml
Lösung C	4 ml	8 ml
Aqua dest.	6 ml	2 ml
Ammoniumpersulfatlösung	8 ml	8 ml

Lösung A

HCl 1 N	48 ml
Tris**	36,3 g
Temed**	0,23 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Lösung C

Acrylamid	7 g
NN'-methylen-	
bisacrylamid	0,184 g
Aqua dest.	ad 25 ml

pH 8,9 gegebenenfalls mit
10 N HCl nachstellen

Ammoniumpersulfat-Lösung

Ammoniumpersulfat	140 mg
Aqua dest.	ad 100 ml

Vor dem Ausgießen werden die Trenngellösungen durch Evakuieren entgast. Ist das "Trenngel" ausgegossen, läßt man in der Wärme polymerisieren.

Das Sammelgel

Hat sich das Trenngel verfestigt, wird mit der ebenfalls entgasten Sammelgellösung 2 cm überschichtet. Nach dem Ausgießen wird in das noch flüssige Sammelgel der Kamm eingeschoben.

* Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

** N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Sammelgel:

Lösung B	2 ml
Lösung D	4 ml
Aqua dest.	8 ml
Riboflavinlösung*	2 ml

Lösung B

Tris	5,98 g
Temed	0,46 ml
HCl 1N bis pH 6,7	
Aqua dest.	ad 100 ml

Lösung D

Acrylamid	2,5 g
NN'-methylen- bisacrylamid	0,63 g
Aqua dest.	ad 25 ml

Riboflavinlösung

Riboflavin	4 mg
Aqua dest.	ad 100 ml

Hat sich das Sammelgel verfestigt, kann der Kamm vorsichtig entnommen werden. Die Glasplatte, die die untere Begrenzung der Küvette bildet, wird durch einen Schwammstreifen ersetzt. Ein derart vorbereitetes Gel kann einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Elektrophorese

Zur Trennung der Proteine wird das Gel senkrecht in die Elektrophoresekammer gebracht.

* Riboflavin wird hier als Polymerisationskatalysator eingesetzt. Die Polymerisation erfolgt am Tageslicht.

Als Kammerpuffer dient ein Tris-Glykokoll^{**}-Puffer pH 8,3.

Elektrodenstammpuffer (Kammerpuffer) pH 8,3

Tris 0,05 M	6,0 g
Glykokoll ^{**} 0,4 M	28,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Vor Gebrauch wird mit Aqua dest. 1 + 4 verdünnt.

Probenbereitung

10 mg Pankreatin werden in 1 ml 10 mM Phosphatpuffer pH 6,8 suspendiert und die Suspension anschließend zentrifugiert. 200 µl der resultierenden Lösung werden mit 800 µl Glycerol (85 %) und 0,1 % Bromphenolblau vermischt. Mit einer Mikroliter-Spritze werden 50 µl der zu trennenden Proben in die Gel-taschen appliziert. Dies entspricht einer Amylaseaktivität bei nativem Pankreatin von ca. 14 FIP-Einheiten.

Laufbedingungen

Um Überhitzungen im Gel und somit eine Denaturierung der Enzyme zu vermeiden, wird die Elektrophorese im Kühlraum bei 277 K (4 °C) durchgeführt.

Spannungs- und Stromzufuhr werden während des Laufes wie folgt verändert:

^{**} Glycin

	Laufzeit	Spannung	Strom
Start	0 min	100 V	3,5 mA
	20 min	140 V	5 mA
	120 min	200 V	8 mA
	360 min	250 V	8 mA
Ende	420 min		

Die Trennung ist beendet, wenn die Bromphenolblaubande 1/2 cm vom unteren Rand entfernt ist.

Färbung

Nach der Trennung wird ein Gel mit Coomassie Brilliant Blau R 250 unspezifisch auf Proteine gefärbt. Neben dieser Positivfärbung erfolgt mit dem zweiten Gel eine negative Färbung, die spezifisch für die α -Amylase ist. Dazu bringt man nach der Trennung das aus den Platten entnommene Gel 10 min in Stärkelösung und bewegt leicht. Danach wird das Gel abgewaschen und in Lugolsche-Lösung eingelegt. Augenblicklich verfärbt sich das Gel nach Blau; nur an den Stellen, an denen die funktionsfähige α -Amylase die Stärke verdaut hat, tritt keine Färbung auf. So ist es möglich, das Enzym genau zu lokalisieren. Um eine weitere Stärkeverdauung zu verhindern, muß nach der Färbung mit Trichloressigsäure inaktiviert werden.

9.2.3. Bestimmung der keimbildenden Einheiten

10 g Pankreatin werden unter dem Laminar-Air-Flow in einer sterilen Reibschale mit 90 g steriler, physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Es ergibt sich eine 10proz. Suspension, welche mit physiologischer Kochsalzlösung geometrisch um den Faktor 10^6 weiterverdünnt wird.

Auf zwei temperierte CSP-Nähragarplatten werden von jeder Verdünnungsstufe 0,02 ml derart aufpipettiert, daß auf der ersten Agarplatte die Ausgangssuspension und die ersten zwei Verdünnungsstufen, auf der zweiten die letzten vier Verdünnungsstufen aufgetragen werden (Abbildung 103).



Abb. 103 Impftechnik

Somit sind auf zwei Zählplatten alle 6 Verdünnungsstufen vertreten. Von jeder Probe werden drei mal zwei Zählplatten angelegt. Die Beobachtungsdauer beträgt 48 Stunden; im allgemeinen wird nach 18 Stunden abgelesen.

Durch diese Bestimmungstechnik spart man einerseits viel Platten- bzw. Nährbodenmaterial und andererseits viel Zeit.

9.2.4. Berechnung der scheinbaren und der maximalen Preßdichte von Oblongtabletten

Die scheinbare Dichte von Oblongtabletten ist aus den geometrischen Größen zugänglich. Durch Ausmessen mit einer Schublehre erhält man:

- Die Tablettenhöhe h
- die Tablettenlänge l
- die Tablettenbreite b und
- die Steghöhe.

Der Wölbungsradius der Komprimierte läßt sich aus diesen Größen wie folgt berechnen:

$$r = \frac{h^2 + s^2 - 2hs + b^2}{4(h - s)} \quad \text{Gl. 17}$$

Mit diesen 5 Abmessungen ist es möglich das Volumen der Oblongtabletten zu errechnen; die Tablette wird dazu in ihre geometrischen Bestandteile zerlegt (Abbildung 104).

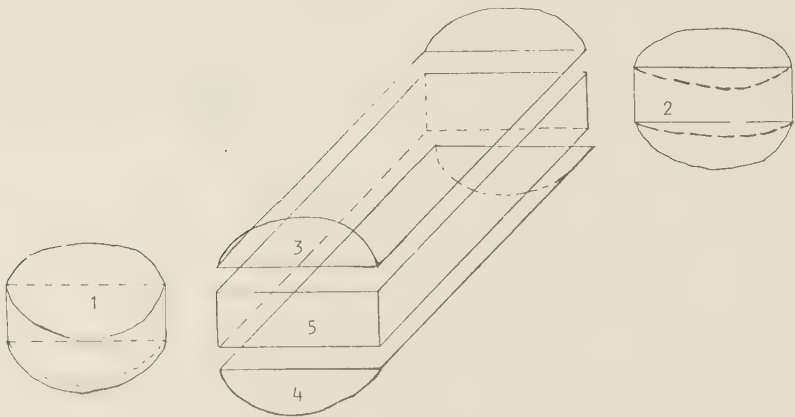


Abb. 104 Geometrische Körper, in die eine Oblongtablette zur Berechnung des Volumens aufgelöst werden kann.

Unter der Annahme, daß sich die beiden Endstücke der Tablette zu einer Oblongtablette mit dem Wölbungsradius r , der Länge b und der Breite r vereinen* lassen, gilt für das Volumen dieses Tablettenabschnitts:

$$V_{1,2} \approx \frac{2 \cdot \left(\frac{h-s}{2}\right)^2 \cdot \pi}{3} \left(3r - \frac{h-s}{2}\right) + \frac{r \cdot b}{4} \pi \cdot s \quad \text{Gl. 18}$$

Das Volumen des Zentralkörpers kann man nach folgender Gleichung ermitteln:

$$V_{3,4,5} = \underbrace{(1-r) \cdot s \cdot b}_5 + \underbrace{2 \cdot \frac{2}{3} b \cdot \left(\frac{h-s}{2}\right) \cdot (1-r)}_{3+4} \quad \text{Gl. 19}$$

Das Volumen von Oblongtablets erhält man dann durch Addition der beiden Tablettenvolumina:

$$\begin{aligned} V_{1,2} + V_{3,4,5} = V \approx & \frac{b}{3} (1 \cdot s - r \cdot s - 2h \cdot r + 2h \cdot 1) + \frac{r \cdot b}{4} \pi \cdot s \\ & + \frac{(h-s)^2 \cdot \pi}{6} \left(3r - \frac{h-s}{2}\right) \end{aligned} \quad \text{Gl. 20}$$

$$\text{Nach } \rho_{\text{sch}} = \frac{m}{V}$$

ergibt sich daraus die scheinbare Dichte.

* Diese Überlegung ist eine Vereinfachung.

Die maximale Preßdichte der Tabletten im Augenblick der Verpressung erhält man aus den Abmessungen der Stempelwerkzeuge und den nach der Tablettierung bestimmten Tablettenmaßen:

Im Augenblick der Verpressung hat der Preßling

- die Breite $b = 7,8 \text{ mm}$

- die Länge $l = 13,8 \text{ mm}$

Setzt man diese Größen ins Verhältnis zu den an der Tablette nach der Tablettierung gemessenen Komprimatabmessungen, so erhält man einen Faktor f :

$$f = \frac{\text{Abmessungen der Stempelwerkzeuge}}{\text{Abmessungen der Tablette}}$$

Multipliziert man die am Preßling bestimmte Tabletten- und Steghöhe mit dem Faktor f (≤ 1), so erhält man annähernd* die Höhe und die Steghöhe im Augenblick der Verpressung. Mit den erhaltenen Größen und den Abmessungen der Stempelwerkzeuge kann man nun mit Gleichung 20 das Volumen im Augenblick der Verpressung berechnen und analog die maximale Preßdichte bestimmen.

... ..

:: Voraussetzung hierfür ist, daß sich die Tablette nach der Kompression gleichmäßig ausdehnt. Aufgrund der isotropen Verformung von Pankreatin bei der Tablettierung ist diese Annahme gerechtfertigt.

9.2.5. Untersuchungen an Schüttgütern und Tabletten

Schüttdichte:

Die Schüttdichte wurde nach DIN 53 468 unter Verwendung der vorgeschriebenen Apparatur ohne weitere Vorbehandlung des Materials bestimmt.

Stampfdichte:

Die Bestimmung der Stampfdichte erfolgte nach DIN E 53 194 unter Verwendung der vorgeschriebenen Apparatur ohne weitere Vorbehandlung der Probe.

Böschungswinkel:

Die Bestimmung erfolgte auf einem Zylinder mit einem Radius von $r = 25 \text{ mm}$. In ein aufgesetztes Rohr mit einem Innendurchmesser von $25,2 \text{ mm}$ wurden ca. 100 g Material locker eingefüllt und aus der Höhe des nach vorsichtigem Abziehen des Rohres entstehenden Pulverkegels der Böschungswinkel nach

$$\tan.\alpha = \frac{h}{r} \qquad \text{Gl. 21}$$

errechnet. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 10 Bestimmungen angegeben.

Bruchfestigkeit:

Die Tabletten wurden mit Hilfe eines ERWEKA-Bruchfestigkeitstesters TBM 28 mit angeschlossenem Printer untersucht (Mittelwert aus 20 Bestimmungen).

Abrieb:

Je 10 g Tabletten wurden im Roche-Friabilator geprüft; 100 Umdrehungen in 4 Minuten.

Zerfallszeit:

Die Bestimmung der Zerfallszeit erfolgte, wenn nicht anders angegeben, analog der in Ph.Eur. III angegebenen Vorschrift. Abweichend betrug die Hubfrequenz 55 Hub/min.

Statistische Auswertung:

Die statistischen Parameter der erhaltenen Tabletten wurden nach den in 9.3. angegebenen Gleichungen berechnet.

9.3. Statistik

Mittelwert $\bar{x}$:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum x_i \quad \text{Gl. 22}$$

x_i = Einzelwert; n = Anzahl der Werte

Standardabweichung s :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Gl. 23}$$

Relative Standardabweichung s_{rel} :

$$s_{\text{rel}} = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} \quad (\%) \quad \text{Gl. 24}$$

Vertrauensbereich des Mittelwertes:

$$VB \ 95 \ \% / 99 \ \% = \bar{x} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \quad Gl. \ 25$$

t ist ein tabellierter statistischer Faktor. Die Werte für ein Vertrauensintervall mit 95 bzw. 99proz. Wahrscheinlichkeit sind in (30) aufgelistet.

Korrelation und Regression

Korrelationskoeffizient r :

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad Gl. \ 26$$

Steigung der Regressionsgeraden b :

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad Gl. \ 27$$

Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y -Achse:

$$\bar{y} = y + b \cdot (x_1 - \bar{x}) \quad Gl. \ 28$$

Zur Prüfung, ob ein Korrelationskoeffizient signifikant ist, benutzt man in (30) tabellarisch aufgelistete Werte, indem man das aus einer Stichprobe n errechnete r mit den in der Tabelle für $n-2$ angegebenen Zufallshöchstwerten vergleicht. Übersteigt r den Tabellenwert, so liegt Signifikanz vor.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten linearen Abhängigkeiten wurden mittels Regressionsanalyse ausgewertet. Soweit nicht anders angegeben, liegt in allen Fällen Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <1 Prozent vor.

9.4. Verwendete Geräte

9.4.1. Analog-Magnetbandaufzeichnungsgerät:

HP 3964 A (Vier-Kanal-)Instrumentation Recorder.

9.4.2. Chromatogramm-Spektralphotometer KM3, C. ZEISS

Mit angeschlossenem Tisch-Integrator.

9.4.3. DTA-Apparatur

Mettler TA 2000 (B) als Tieftemperaturausführung (-175 bis $+550$ °C).

Heiz/Kühlbereich	0,1 - 29,9 K/min
Meßbereich: DTA	100 μ V
spez. Wärme	200 μ V
Probenbehälter	Alutiegel, Deckel perforiert, 160 μ l
Referenz	Alutiegel, Deckel perforiert, 160 μ l

Spülgas Stickstoff, nachgereinigt, 25ml/min.
 Einwaagen DTA: Ca. 30 mg
 spez. Wärme ca. 30 mg

On-line-Betrieb mit Calculator HP 9815 A; Datenausgabe über
 Protokoll bzw. Plotter HP 7225 A.

Mettler Mikrowaage ME 22 mit Steuergerät BE 22 und Digital-
 anzeigegerät BA 25.

9.4.4. Elektrophoreseapparatur

Eigenbau: Institut für Physiologische Chemie der Universi-
 tät Erlangen-Nürnberg.

9.4.5. HPLC-Anlage

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
UVIKON 720 LC	UV/VIS-Detektor	Kontron
MULTIREF 912 B	RI-Detektor	Optilab
ALTEX 110A	HPLC-Pumpe	Altex
ALTEX	Mischer	Altex
TOUZAR	Pulsationsdämpf.	Atignon
RHEODYNE 7125	Einspritzventil	Rheodyne

Trennsäule: Lichrospher® 500 Diol, 250 x 4 mm
 mittlere Korngröße 10 µm

9.4.6. Hutt-Kompaktor

Hersteller: Hutt GmbH, Leingarten-Heilbronn.

9.4.7. Mühlen

Kugelmühle Primax

Kl. Kupper, 5337 Swisttal 3

Innendurchmesser 100 mm, 18 Mahlkugeln von 24 mm Ø und
19 g Gewicht

Materialeinwaage: 55 g

Umdrehungsgeschwindigkeit: 75 UpM

Retsch-Mörsermühle

Mikro-Schnellmühle Typ MS

Mahlbedingungen:

Materialeinwaage	ca. 800 mg
Mörserdrehzahl	300 UpM (50 Sekt)
Pistilledrehzahl	1500 UpM (50 Sekt)
Mahlgarnitur	Achat 25 ml
Mahldauer	max. 60 min

9.4.8. Pflugscharmischer

Lödige M 5 GR, mit Disco-Verstellgetriebe.

9.4.9. Prozeßrechner

MINC 11, Fa. Digital Equipment Corp.,

Peripherie: Plotter HP 7225 A,

Printer M 43, Tele Type Corp.

9.4.10. Raster-Elektronenmikroskope

JSM-U 3 Scanning-Electron Microscope,

Hersteller: Japan Electron Optics Laboratory Co.Ltd., Tokyo.

Sputter-Anlage	Fa. E. Leitz, Wetzlar
Glühkathode	Au
Heizstrom	1,5 mA
Spülgas	Argon
Besputterungsdauer	Pulver: Ca. 5 min Tabletten: Ca. 10 min
Kammerdruck	13,3 Pa

Siemens Autoscan MP 43.

9.4.11. Röntgendiffraktometer

Philips-Röntgenpulverdiffraktometer mit:

- Röntgengenerator PW 1730
- Vertikalgoniometer PW 1050
- Schrittmotor und Steuereinheit PW 1394
- Proportionalzählrohr PW 1965/60
- Verstärkereinheit PW 1390 mit Impulshöhendiskriminator
- Recorder PM 8203
- Röntgenröhre PW 2233/20; Focus N, Cu-Anode,
Cu-K α -Strahlung mit $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$

Sonderzubehör:

- TTK-Röntgen-Vakuumkamera für mittlere und tiefere
Temperaturen, Kat.Nr. 25 100
 - TTK-Heizregler, Kat.Nr. 25 110
- Hersteller: Fa. A. Paar KG, A-Graz

Betriebsbedingungen:

Anodenspannung	40 kV
Heizstrom	30 mA
Meßbereich	entfällt bei on-line Datentransfer
Winkelgeschwindigkeit	$0,02^{\circ} \cdot 2 \theta/s$ (Step)
Dämpfung	1 s
Filter	Nickel, im Primärstrahl
Aperturblende	1°
Zählrohrblende	1° , 0,2 mm
Auswertung	On-line über Calculator HP 9815 A in Verbindung mit Plotter HP 7225 A

9.4.12. Siebmaschine

Fritsch-Pulverisette mit Siebeinsätzen nach DIN 4188:
1000/500/250/125/63/40 μm Maschenweite, 200 mm $\emptyset$.

9.4.13 Spektralphotometer

Beckman Instruments, Modell 24 mit UV-Zusatzausrüstung,
Sipper-System und Schreiber.

9.4.14 TablettenmaschinenAnlage zur Herstellung von Mikrotabletten

Gummiformen	Durchmesser	130 mm
	Dicke	15 mm
	Gewicht	200 g
	Material	Silikonkautschuk

Abmessungen der Vertiefungen in der Form (Durchmesser = Tiefe)	Anzahl der Vertiefungen pro Form
--	-------------------------------------

1,5	3000
4,0	440
8,0	100

Maschinen

Automatische Mikrotablettenpresse MTP 1000

Predruck 10 - 100 MPa

Hersteller Nukem GmbH, Hanau

Hydraulische Presse für den manuellen Betrieb:

Ständerpresse

Preßdruck 30 - 300 MPa

Hersteller: H. Holland, Etville

Steuerung: Eigenbau, Firma NUKEM

Fette-Perfekta 2000 Cooltex

Maschine

Fette Perfecta 2000 Klimatex

- Matrizentisch

- Fill-o-matic und

- Fülltrichter

sind mit dem Flüssigkeitskühlsystem kühlbar.

Hersteller: W. Fette GmbH, Schwarzenbek/Hamburg

Flüssigkeitskühlsystem

Kühlflüssigkeit: Glycerol/Wasser

Maximale Kühlung: 267 K (-6 °C)

Hersteller: Testotherm KG, Lenzkirch

Zuluftsystem

Berner Luftentfeuchtungsanlage Typ M 600 - 5 EVS

Technische Daten

Luftmenge	600 m ³ /h
Lufteintritt	303 K (30 °C) 70 % rF
Luftaustritt	276 K (3 °C) 70 % rF

Hersteller: Berner GmbH, Hamburg

Temperaturüberwachung

Fünf Thermomeßfühler mit digitalem Meßstellenumschalter

Hersteller: Testotherm KG, Lenzkirch

Fette Perfecta 3000

Hersteller: s.o.

Instrumentierte Tablettenpresse

Fette Hanseaten Exacta 1

Hersteller: s.o.

Instrumentierung: DMS in Vollbrückenschaltung an Ober- und Unterstempelhaltern.

Induktiver Wegaufnehmer W 50 K in Halbbrückenschaltung.

Hersteller: Hottinger-Baldwin-Meßtechnik GmbH, Darmstadt.

Meßelektronik: Trägerfrequenzmeßbrücken Philips PR 9307, 2-Kanal-Speicher-Oszillograph Philips PM 3234.

9.4.15. Temperaturmeßgeräte

Infrarot-Spektralpyrometer Thermophil Infra T 203 mit Strahlungsempfänger T 1061

Hersteller: Ultrakust-Gerätebau GmbH & Co. KG,
D-8375 Ruhmannsfelden

Philips Miniaturschreiber PR 2400 A mit Philips Thermocoax
Miniatur Thermoelement CA 45500.

Hersteller: Philips GmbH, Kassel.

9.4.16 Thermogravimetrie-Apparatur

Mettler-Thermoanalysenwaage HE 20 mit Steuergerät BE 20
und X-Y-Schreiber Omnigraphic 2000 (Houston, Texas).

Meßbedingungen:	Einwaage	ca. 70 mg
	Heizrate	5 K/min
	Ausgang BE 20	1 V
	Meßbereich BE 20	100 mg
	Abszisse	5 K/min
	Ordinate	0,5 mg/cm

9.4.17 Zentrifuge

Typ 8590 mit Steuer-Gerät, Fa. Heraeus, Hanau.

9.5. Verwendete Materialien

9.5.1. Pankreatin und die α -Amylase

Nutrizym-Granulat (Trockengranulat N) MERCK, Darmstadt

Pankreatin 6 x NF	80 %
Fel Tauri	6 %
Talkum	
Magnesiumstearat	
Cellulosepulver	ad 100 %

Pankreatin 4 x NF MERCK, Darmstadt

An dieser Stelle soll die in dieser Arbeit primär untersuchte pankreatische α -Amylase kurz beschrieben werden.

Bei Tieren findet man α -Amylase im Pankreas, im Speichel, in der Leber, im Blut, im Harn und im Muskel. Außerdem ist sie in keimendem Getreide, Malz, in Schimmelpilzen und Bakterien nachweisbar.

α -Amylase ist eine Endo-Hydrolase, spaltet α 1-4-glukosidische Bindungen. So entstehen z.B. aus einer Stärkesuspension in schneller Reaktion Oligosaccharid-Mischungen, Endprodukt ist Maltose. Die beim Abbau entstandenen Produkte besitzen α -Konfiguration. Gemäß der internationalen Nomenklatur für Enzyme wird die α -Amylase als 1,4- α -D-glucan-glucano-hydrolase (EC 3.2.1.1.) bezeichnet.

Die aus dem Pankreas gewonnene α -Amylase ist in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,5 stabil, der optimale Wert liegt bei pH 6,8. Zur Entfaltung ihrer Aktivität braucht sie verschiedene Ionen; so benötigt sie Chlorid-Ionen in einer Konzentration von mindestens 0,005 M. Geringe Mengen Calcium sind sowohl für die Aktivität als auch für die Stabilität erforderlich. Das Molekulargewicht des oligomeren Proteins beträgt

ca. 50 000. Nach ROBYT et al. (108) setzt sich die α -Amylase aus 4 Untereinheiten zusammen. Jede dieser Untereinheiten ist enzymatisch aktiv und besitzt ein Molekulargewicht von 12 500 (vergleiche Abbildung 76 und 77).

Pankreatin Granulat 6 x NF

BRUNNENGRÄBER, Lübeck

Pankreatin Pulver 6 x NF

BRUNNENGRÄBER, Lübeck

9.5.2. Weitere Materialien

Tablettierung

Ac-Di-Sol

FMC Corporation, Philadelphia USA,
Vertrieb durch Lehmann & Voss & Co.,
Hamburg

Aerosil 200

Degussa, Frankfurt/Main

Avicel PH 101

FMC Corporation, Philadelphia USA,
Vertrieb durch Lehmann & Voss & Co.,
Hamburg

Elcema P 100

Degussa, Frankfurt/Main

Methocel E 5 prem.

DOW Chemical, Stade-Brunshausen

Magnesiumstearat

Merck Darmstadt, Art.Nr. 5876

Enzymanalytik

Die verwendeten Substanzen sind unter 9.2.1. mit aufgeführt; soweit nichts anderes angegeben, wurden Merck-Chemikalien verwendet. Vom Center for Standards der F.I.P. (Wolterslaan 12, 9000 Gent/Belgien) können die Enzym-Standards bezogen werden.

Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese

Acrylamid 2 x kríst. p.A.	Serva, Heidelberg, Art.Nr. 10675
Ammoniumperoxydisulfat	Merck, Darmstadt, Art.Nr. 1201
Bromphenolblau Nasah	Serva, Heidelberg, Art.Nr. 15375
N,N'-Methylbisacrylamid	Serva, Heidelberg, Art.Nr. 29195
Serva Blau G reinst	
(= Coomassie Brilliant	
Blau G-250)	Serva, Heidelberg, Art.Nr. 35050
Stärke löslich p.A.	Merck, Darmstadt, Art.Nr. 1252
N,N,N',N'-Tetramethyl	
äthylendiamin mind. 99%	Serva, Heidelberg, Art.Nr. 35925
Tris-(hydroxymethyl)-	
aminomethan	Serva, Heidelberg, Art.Nr. 37180

Mikrobiologie

Agar No. 1 L 11	Oxoid, Wesel
Ätherische Öle und Terpene	der Firmen Dragoco, Holzminden und Firmenich, Genf
Chloramphenicol	Andreae Noris Zahn AG, Nürnberg
Sabouraud liquid Medium	
CM 147	Oxoid, Wesel
Tryptone Soja Broth CM 129	Oxoid, Wesel
(= Caseinpepton-Soja-Pepton)	

10. Literatur

- 1) Statistisches Bundesamt,
Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 1609 (1983).
- 2) Junge, U.,
Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 1639 (1982).
- 3) Siegenthaler, W.,
Klinische Pathophysiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.
- 4) Junge, U.,
Dtsch. Apoth. Ztg. 121, 2499 (1981).
- 5) Biochemie und therapeutische Anwendung von Verdauungs-
enzymen. Internationales Symposium, Pörschach, 1972,
Stormarn-Verlag.
- 6) Graf, E., A. Sakr,
Pharm. Ind. 41, 86 (1979).
- 7) Graf, E., H. Ghanem, A.A. Fawzy,
Pharm. Ind. 44, 1177 (1982).
- 8) Hüttenrauch, R., I. Keiner,
Pharmazie 31, 654 (1976).
- 9) Nada, A.,
Dissertation Tübingen 1983.
- 10) Härtlich, Ch.,
Pharm. Ztg. 123, 2185 (1978).
- 11) Grigo, J.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 3, 13 (1977).
- 12) Krüger, D.,
Pharm. Ind. 35, 569 (1973).

- 13) Lommer, C.M.,
Dissertation Erlangen-Nürnberg 1983.
- 14) Pohler, W.,
Dissertation Erlangen-Nürnberg 1983.
- 15) Peschke, G.,
APV-Fortbildungslehrgang "Gastroenterologika"
Regensburg, November 1982.
- 16) Thews, G.,
Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 1589 (1982).
- 17) Mutschler, E.,
Arzneimittelwirkungen (4. Auflage). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1981.
- 18) Maiwald, L.,
Med. Klin. 74, 1569 (1979).
- 19) Rick, W. et al.,
Störungen der Verdauung und Resorption.
Wissenschaftliche Berichte, Merck, Darmstadt 1971.
- 20) Thews, G., E. Mutschler, P. Vaupel,
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1980.
- 21) Vaupel, P.,
Apotheker Journal 26 (1981).
- 22) Dölle, W.,
Der Gastrointestinaltrakt und seine medikamentöse Beeinflussung. Weiße Reihe der Bundesapothekerkammer
Band VII, S. 27, 1977.
- 23) Ehrhardt, L.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 1, 125 (1976).

- 24) Ruysen, R., A. Lauwers,
Pharmaceutical Enzyms.
E. Story-Scientia Gent/Belgien 1978.
- 25) Mündliche Firmenmitteilung Nordmark-Werke GmbH, Hamburg.
- 26) Hennrich, N.,
Pharm. Ind. 31, 228 (1969).
- 27) Sucker, H., P. Fuchs, P. Speiser,
Pharmazeutische Technologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978.
- 28) List, P.H.,
Arzneiformenlehre. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
mbH, Stuttgart, 1982.
- 29) Nürnberg, E.,
Habilitationsschrift Universität Marburg/Lahn 1970.
- 30) Martin, A., J. Swarbrick, A. Cammarata,
Physikalische Pharmazie (2. Auflage). Wissenschaftliche
Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1980.
- 31) Mündliche Mitteilung, Prof. Dr. H. Kersten.
- 32) Hopp, A.,
Dissertation Erlangen-Nürnberg 1981.
- 33) Fuchs, P.,
Arch. d. Pharm. 303, 471 (1970).
- 34) Hess, H.,
Pharmazie in unserer Zeit 6, 131 (1977).
- 35) Nürnberg, E., R. Muckenschnabel,
Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 2093 (1982).
- 36) Berndt, W., et al.,
Med. Klin. 65, 2281 (1970).

- 37) Müller, H.,
Pharm. Ztg. 46, 2254 (1980).
- 38) Speiser, P.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 1, 81 (1976).
- 39) Libicky, A., B. Svobodova, J. Synek,
Pharmazie 23, 21 (1968).
- 40) Lehninger, A.L.,
Biochemie. Verlag Chemie, Weinheim - New York 1979
(2. Auflage).
- 41) Fasold, H.,
Die Struktur der Proteine. Verlag Chemie, Weinheim -
New York 1972.
- 42) Fasold, H.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 1, 51 (1976).
- 43) Dickerson, R.E., I. Geis,
Struktur und Funktion der Proteine.
Verlag Chemie, Weinheim - New York 1975.
- 44) Suzuki, K., Y. Taniguchi,
Symp. Soc. Exp. Biol. 26, 103 (1972).
- 45) Suzuki, K., K. Kitamura,
J. Biochem. 54, 214 (1963).
- 46) Kauzmann, W.,
Proc. Int. Conf. High Pressure, 4th 619 (1975).
- 47) Heremans, K.,
Nato Adv. Study Inst. Ser. Ser.: C 41, 467 (1978).
- 48) Boyer,
The Enzyms. Academic Press New York 3th Edition Vol. V
115 1970.

- 49) Horikoshi, J., N. Takeguchi, M. Morii, A. Sano,
Chem. Pharm. Bull (Tokyo) 21, 2136 (1973).
- 50) Graf, E., A. Sakr, A. Nada,
Pharm. Ind. 42, 1031 (1980).
- 51) Graf, E., A. Sakr, A. Nada,
Pharm. Ind. 43, 282 (1981).
- 52) Blaich, R.,
Analytische Elektrophoreseverfahren.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978.
- 53) Feldkamp, H., P. Fuchs, H. Sucker,
Pharmazeutische Qualitätskontrolle.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 1983.
- 54) Thoma, K.,
Arzneimittelstabilität. Werbe- und Vertriebsgesell-
schaft Deutscher Apotheker mbH, Frankfurt/M., 1978.
- 55) Grimm, W., G. Schepky,
Stabilitätsprüfung in der Pharmazie.
Editio Cantor KG, Aulendorf, 1980.
- 56) Rawn, J.D.,
Biochemistry.
Harper & Row, Publishers, New York, 1983.
- 57) Wittgenstein, E., H.K. Berry,
Journ. Invest. Derm. 36, 283 (1961).
- 58) Moll, F., A. Müller,
Reflexionsspektrometrische Qualitätskontrolle
gefärbter Arzneiformen.
APV-Jahreskongreß München 1982.
- 59) Hüttenrauch, R., J. Jacob,
Acta Pharm. Technol. 28, 44 (1982).

- 60) Hiestand, E.N., J.E. Wells, C.B. Poet, J.F. Ochs,
J. Pharm. Sci. 66, 510 (1977).
- 61) Junginger, H.,
Pharm. Ind. 38, 388 (1976).
- 62) Carter, J.V., D.G. Knox, A. Rosenberg,
J. Biol. Chem. 253, 1947 (1978).
- 63) Ikkai, T., T. Ooi,
Biochemistry 8, 2615 (1969).
- 64) Neumann, C.R., D. Owen, G.D. Lockyer,
J. Am. Chem. Soc. 98, 2982 (1976).
- 65) Rees, J.E., P.J. Rue,
J. Pharm. Pharmacol. 30, 601 (1978).
- 66) Schönert, K.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 6, 5 (1978).
- 67) Voigt, R.,
Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie (4. Auflage).
Verlag Chemie, Weinheim - New York 1982.
- 68) Parmentier, W.,
Dissertation Braunschweig 1974.
- 69) Rees, J.E., P.J. Rue,
J. Pharm. Pharmacol. 29, 37P (1977).
- 70) Führer, C.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 6, 129 (1978).
- 71) Dürr, M., D. Hanssen, H. Harwalik,
Pharm. Ind. 34, 905 (1972).
- 72) Dürr, M.,
Acta Pharm. Technol. 22 (3), 185 (1976).

- 73) Nürnberg, E., A. Hopp,
Technische Nachrichten Fette 8003 1981.
- 74) Müller, F.,
APV-Jahreskongreß München 1982.
- 75) Führer, C., W. Parmentier,
Acta Pharm. Technol. 23 (3), 205 (1977).
- 76) Nürnberg, E., A. Hopp,
Dtsch. Apoth. Ztg. 121, 1133 (1981).
- 77) Weichert, R.,
Dissertation Karlsruhe 1976.
- 78) Rankell, A.S., T. Higuchi,
J. Pharm. Sci. 57, 574 (1968).
- 79) Thiel, F.,
Dissertation Braunschweig 1975.
- 80) Müller, M.L.,
Dissertation Braunschweig 1976.
- 81) Travers, D.N., P.H. Merriman,
J. Pharm. Pharmacol. 22, 115 (1970).
- 82) Hanus, E.J., L.D. King,
J. Pharm. Sci. 57, 677 (1968).
- 83) de Bumann, A., A. Riva, H.R. Surer, M. Steiger,
H. Sucker,
Pharm. Ind. 43, 276 (1981).
- 84) Graf, E., A.H. Ghanem und A. Nada,
Pharm. Ind. 45, 81 (1983).
- 85) Hüttenrauch, R., I. Keiner,
Pharmazie 31, 575 (1976).

- 86) El-Banna, H.M., N. Baraie und H.A. El-Shibini,
Pharmazie 36, 772 (1981).
- 87) Fuchs, P.,
Galenik-Kolloquium, Berlin (1968).
- 88) Wiederkehr v. Vinzenz, C.,
Dissertation Zürich 1979.
- 89) Jones, T.M.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 6, 141 (1978).
- 90) Hüttenrauch, R.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 6, 55 (1978).
- 91) Schmidt, M.A.,
Dissertation Braunschweig 1978.
- 92) Schepky, G.,
Acta Pharm. Technol. 21 (4), 267 (1975).
- 93) Führer, C., E. Nickel, F. Thiel,
Acta Pharm. Technol. 21 (3), 149 (1975).
- 94) Herrmann, W.,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 6, 25 (1978).
- 95) Rankell, A., T. Higuchi,
J. Pharm. Sci. 57, 574 (1968).
- 96) Bal'shin, M.Y.,
Vestnik. Metalloprom. 18, 124 (1938).
- 97) Heckel, R.W.,
Trans. Metall. Soc. 221, 671 (1961).
- 98) Tanford, G.,
Adv. Protein Chem. 23, 121 (1968).

- 99) Tanford, G.,
Adv. Protein Chem. 24, 1 (1970).
- 100) Stamm, A., S. Mathis,
Acta Pharm. Technol. Suppl. 1, 7 (1976).
- 101) Müller, F., B. Emschermann,
Pharm. Ind. 43, 191 (1981).
- 102) David, S.T., L.L. Augsburg,
J. Pharm. Sci. 66, 155 (1977).
- 103) Schott, M.J., J.M. Newton, P. Stanley,
APV-Jahreskongreß, München 1982.
- 104) Maurer, M.R.,
Disk-Elektrophorese.
Verlag Walter de Gruyter, Berlin 1968.
- 105) Darnall, D.W., I.M. Klotz,
Arch. Biochem. Biophys. 166, 651 (1975).
- 106) Conellan, J.M., D.C. Shaw,
J. Biol. Chem. 245, 2845 (1970).
- 107) Mitchell, F.D., P. Riquetti, R.H. Loring und
K. Carraway,
Biochem. Biophys. Acta 295, 314 (1973).
- 108) Robyt, J.F., C.G. Chittenden und C.T. Lee,
Arch. Biochem. Biophys. 144, 160 (1971).
- 109) Roth, B.,
Pharmazie in unserer Zeit 10, 50 (1981).
- 110) Engelhardt, H.,
Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977.

- 111) Determann, H.,
Gelchromatographie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- 112) E. Merck, Darmstadt,
Herstellerinformation zu Li-Chrospher[®]/2 von Merck-
Reagenzien (28/9121/2/1281 R).
- 113) Gerst, F.,
Dissertation Erlangen-Nürnberg 1979.
- 114) Ananthanarayanan, V.S., C.C. Biglow,
Biochemistry 8, 3717 (1969).
- 115) Smillie, L.B.,
Biochim. Biophys. Acta 34, 548 (1959).
- 116) Isemura, T., A. Imanischi,
J. Biochemistry 51, 172 (1962).
- 117) Imanischi, A., et al.,
J. Biochemistry 54, 89 (1963).
- 118) Imanischi, A., et al.,
J. Biochemistry 55, 562 (1964).
- 119) Hoffmann, E.,
Eiweiße und Nucleinsäuren als biologische Makromoleküle
(3. Auflage). Akademie Verlag, Berlin 1975 Teil 1.
- 120) Informationsschriften der Firma NUKEM.
- 121) Ph. Eur. - Entwurf zu
"Control of microbiological contamination in products
not required to comply with test for sterility"
PA/PH/Exp.1 M/T/(76)37th revision, 28. May 1979.
- 122) Kellner, W., W. Kober,
Arzneimittelforschung 4, 319 (1954).

- 123) Kellner, W., W. Kober,
Arzneimittelforschung 5, 224 (1955).
- 124) Kellner, W., W. Kober,
Arzneimittelforschung 6, 76 (1956).
- 125) Schürmann, C., H. Kühlwein,
Zbl. Bakt. I. Orig. 178, 372 (1960).
- 126) Schürmann, C., W. Spitzner,
Zbl. Bakt. I. Orig. 180, 234 (1962).
- 127) Wallhäüßer, K.H.,
Sterilisation, Desinfektion, Konservierung (2. Auflage).
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1978.
- 128) Wallhäüßer, K.H., H. Schmidt,
Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemothe-
rapie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1967.
- 129) Eggensperger, H.,
Dtsch. Apoth. Ztg. 122, 2599 (1982).
- 130) Nowak, G.A.,
Die kosmetischen Präparate (2. Auflage).
Verlag für Chemische Industrie H. Ziałkowsky KG, Augsburg
1975.
- 131) Martindale,
The Extra Pharmacopoeia, 27th Edition.
The Pharmaceutical Press, London (1977).
- 132) Handbuch der Lebensmittelchemie,
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1965).

LEBENS LAUF

Name : Winfried Bernhard Anton Hamperl
 20.08.1955 : Geboren in Weiden/Oberpfalz

 Vater : Josef Hamperl, Oberstudiendirektor a.D.
 Mutter: Anna Hamperl, geb. Wolf, Hausfrau

 1961 - 1966 : Besuch der Volksschule in Weiden
 1966 - 1975 : Besuch des Kepler-Gymansiums in Weiden
 20.06.1975 : Reifeprüfung
 WS 1975/76 - : Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
 WS 1979/80 :
 20.09.1978 : Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

 02.06.1980 : Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

 01.06.1980 - : Pharmaziepraktikant in der Hirsch-Apotheke
 30.11.1980 in Fürth/Bayern

 ab : Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft
 01.12.1980 bei Herrn Prof. Dr. E. Nürnberg am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie

 06.03.1981 : Eheschließung mit der Apothekerin Gertraude Schlosser

 02.07.1981 : Dritter Prüfungsabschnitt der pharmazeutischen Prüfung

 04.08.1981 : Approbation als Apotheker

 25.08.1981 : Geburt einer Tochter.

